

# Nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von Antikörpern auf Hefezellen

Vom Fachbereich Chemie



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DARMSTADT

der **Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Biologin Laura Rhiel

aus Marburg/Lahn

Referent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Korreferent: Prof. Dr. Siegfried Neumann

Tag der Einreichung: 25. Oktober 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2012

Darmstadt 2013

D17

---

Laura Rhiel  
Luxemburgerallee 44  
60385 Frankfurt/Main

25. Oktober 2012

Erklärung 1

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

---

---

---

Laura Rhiel  
Luxemburgerallee 44  
60385 Frankfurt/Main

25. Oktober 2012

## Erklärung 2

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

---

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	VI
Tabellenverzeichnis .....	IX
Abkürzungsverzeichnis .....	X
<b>1 Einleitung und Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Prozess der Wirkstofffindung.....	3
1.2 Wirkstoffklassen.....	4
1.3 Struktur und Funktion von Antikörpern .....	6
1.3.1 Rekombinante Antikörper-Fragmente.....	8
1.3.2 <i>Camelidae</i> VHH-Fragmente.....	9
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> Protein A .....	12
1.5 Antikörper-Engineering.....	13
1.6 Gerichtete Evolution und Durchmusterung von Molekülbibliotheken .....	14
1.7 Oberflächenpräsentation auf Hefezellen.....	15
1.8 Das a-Agglutinin System .....	16
1.9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Expressionssystem .....	17
1.10 Antikörperexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	18
<b>2 Materialien .....</b>	<b>20</b>
2.1 Bakterienstämme .....	20
2.2 Hefestämme.....	20
2.3 Nährmedien für die Kultivierung von Bakterienzellen .....	20
2.4 Nährmedien für die Kultivierung von Hefezellen.....	21
2.5 Plasmide .....	24
2.6 Oligodesoxyribonukleotide.....	26
2.7 Proteine .....	29
2.7.1 Enzyme .....	29
2.7.2 Antikörper und Zielproteine .....	29
2.7.3 Sonstiges.....	30
2.8 Größenstandards .....	31

---

2.9	Chemikalien.....	32
2.10	Puffer und Lösungen.....	33
2.11	Kommerziell erhältliche Systeme .....	35
2.12	Verbrauchsmaterialien .....	35
2.13	Geräte.....	36
2.14	Computerprogramme.....	38
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>39</b>
3.1	Mikrobiologische Methoden.....	39
3.1.1	Anzucht und Vermehrung von Bakterienzellen .....	39
3.1.2	Chemische Transformation von Bakterien .....	39
3.1.3	Plasmidisolierung aus Bakterien .....	39
3.1.4	Anzucht von Hefezellen.....	40
3.1.5	Mutagenese mittels 5-Fluororotsäure .....	40
3.1.6	Lagerung von Hefezellen.....	40
3.1.7	Bestimmung der Zelldichte von Hefekulturen.....	41
3.1.8	Transformation von Hefezellen .....	41
3.1.8.1	Herstellung und Transformation kryokonservierter Hefezellen.....	41
3.1.8.2	Transformation von Hefezellen zur Bibliotheksgenerierung .....	42
3.1.9	Lagerung von Hefe-Bibliotheken .....	43
3.1.10	Plasmidisolierung aus Hefezellen .....	43
3.1.11	Präparation genomischer DNA aus Hefezellen .....	43
3.1.12	Plasmidkonstruktion mittels homologer Rekombination in Hefezellen.....	43
3.1.13	Heterologe Genexpression in Hefezellen.....	44
3.1.14	Oberflächenpräsentation der VHH-Bibliotheken .....	45
3.1.15	Fluoreszenzmarkierung Oberflächen-präsentierter Proteinen auf Hefezellen ...	45
3.1.16	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung .....	46
3.1.17	Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung .....	47
3.1.18	Fluoreszenzmikroskopie .....	48
3.1.19	Dialyse von Kulturüberständen.....	48
3.2	Biochemische Methoden .....	49

---

---

3.2.1	Protein A-Affinitätschromatographie .....	49
3.2.2	Pufferaustausch mit PD-Säulen.....	49
3.2.3	Deglykosylierung von Proteinen mittels Endoglykosidase H.....	50
3.2.4	Biotinylierung von Proteinen mit Sulfo-NHS-Biotin .....	50
3.2.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels NanoDrop.....	50
3.2.6	Präzipitation von Proteinen aus Kulturüberständen .....	50
3.2.7	Proteinpräparation aus Hefezellen.....	51
3.2.8	Biolayer-Interferometrie .....	51
3.2.9	Polyacrylamidgelelektrophorese .....	53
3.2.10	Coomassie-Färbung von Proteingelen .....	53
3.2.11	Western-Blot Analyse .....	53
3.3	Molekularbiologische Methoden .....	55
3.3.1	Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	55
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	55
3.3.3	<i>Gap-Repair</i> PCR.....	55
3.3.4	PCR zur Analyse von Klonierungsprodukten .....	57
3.3.5	Mutagenese von DNA-Sequenzen .....	57
3.3.5.1	Ortsgerichtete Mutagenese .....	58
3.3.5.2	<i>Error-prone</i> PCR.....	59
3.3.6	Endonukleolytische Restriktion von DNA.....	59
3.3.7	Agarosegelelektrophorese.....	60
3.3.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen .....	60
3.3.9	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	60
3.3.10	Ligation von DNA-Fragmenten .....	60
3.3.11	Klonierung von PCR-Produkten mit TA-Überhang .....	61
3.3.12	Klonierung von <i>blunt-end</i> PCR-Produkten.....	62
3.3.13	Reinigung von PCR-Produkten .....	62
3.3.14	Sequenzierung .....	62

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
4.1	Herstellung eines Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen .....	64
4.2	Generierung eines PDI-überexprimierenden Hefestammes .....	66
4.3	Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen .....	70
4.4	Quantifizierung von VHH-Fc Fusionsproteinen in Kulturüberständen .....	75
4.5	Lösliche VHH-Fc Sekretion Affinitätschromatographie.....	80
4.6	Funktionalitätsanalyse von Hefe-produzierten VHH-Fc Fusionsproteinen .....	83
4.7	Glykosylierung des VHH-Fc Fusionsproteins.....	86
4.8	Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne .....	89
4.9	Klonierungsstrategie der Fc-Bindedomäne .....	89
4.10	Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne .....	91
4.11	Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen.....	96
4.12	Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen .....	100
4.13	Stabilitätsanalyse der VHH-Fc:ZZ-Interaktion.....	103
4.14	Oberflächenpräsentation verschiedener VHH-Fc Fusionsproteine .....	106
4.15	Genotyp-Phänotyp-Kopplung .....	109
4.16	Mischungsexperiment 1 .....	109
4.16.1	Anreicherung von Zielzellen mittels MACS .....	110
4.16.2	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	112
4.17	Mischungsexperiment 2 .....	115
4.17.1	Anreicherung von Zielzellen mittels MACS .....	116
4.17.2	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	116
4.18	Wechsel zwischen Oberflächenpräsentation und löslicher Sekretion.....	125
4.19	Herstellung verschiedener VHH-Bibliotheken.....	130
4.19.1	Herstellung der Bibliothek A .....	132
4.19.2	Qualitätskontrolle der Bibliothek A.....	133
4.19.3	Herstellung der Bibliothek B.....	135
4.19.4	Qualitätskontrolle der Bibliothek B.....	136
4.19.5	Herstellung der Bibliothek C .....	138

---

4.19.6	Qualitätskontrolle der Bibliothek C.....	139
4.20	Charakterisierung der Bibliotheken.....	140
4.21	Durchmusterung der Bibliothek A.....	143
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>152</b>
5.1	Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne .....	152
5.2	Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen.....	154
5.3	Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen .....	155
5.4	Optimierung der Oberflächenpräsentation und Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen .....	156
5.5	Funktionalität von Hefe-produzierten VHH-Fc Fusionsproteinen.....	160
5.6	Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen .....	162
5.7	Genotyp-Phänotyp-Kopplung .....	165
5.8	Generierung verschiedener VHH-Bibliotheken.....	167
5.9	Schaltbare Oberflächenpräsentation.....	170
5.10	Durchmusterung der Bibliothek A.....	172
<b>6</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>176</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>177</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>190</b>
8.1	Proteinsequenzen von hsEGFR und mmEGFR .....	190
8.2	Oligodesoxyribonukleotid zur Herstellung der Bibliothek B.....	191
8.3	Lebenslauf .....	193
8.4	Danksagung .....	194



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der Prozess der Wirkstofffindung. ....	4
Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls. ....	7
Abb. 1.3: Rekombinante Antikörper-Fragmente. ....	9
Abb. 1.4: Antikörperrepertoire der <i>Camelidae</i> . ....	10
Abb. 1.5: Vergleich einer humanen VH-Domäne und einer cameliden VHH-Domäne. ....	11
Abb. 1.6: Schematische Darstellung von <i>S. aureus</i> SpA und SpA-abgeleiteten Domänen. ....	12
Abb. 1.7: Oberflächenpräsentation auf Hefezellen nach Boder und Wittrup. ....	17
Abb. 2.8: Plasmide zur Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne. ....	24
Abb. 2.9: Plasmide zur löslichen Sekretion. ....	24
Abb. 2.10: Plasmide zur löslichen Sekretion von IgG-Molekülen. ....	25
Abb. 2.11: Plasmide zur chromosomalen PDI-Integration. ....	25
Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen und löslicher Produktion. ....	64
Abb. 4.2: Schematischer Vergleich zwischen IgG-Molekül und VHH-Fc Fusionsprotein. ....	65
Abb. 4.3: Western-Blot Analyse der episomalen PDI Expression in Hefezellen. ....	68
Abb. 4.4: Western-Blot Analyse der chromosomalen PDI-Expression in Hefezellen. ....	69
Abb. 4.5: Analyse der löslichen VHH-Fc Sekretion. ....	71
Abb. 4.6: Prozessierung des VHH-Fc Fusionsproteins. ....	72
Abb. 4.7: Einfluss von Polyethylenglykol auf die Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen. ...	74
Abb. 4.8: VHH-Fc Sekretionsausbeuten aus APO-E und EBY100 Expressionskulturen. ....	75
Abb. 4.9: Exemplarische Biolayer-Interferometrie-Messprofile mit und ohne PEG-Zusatz. ....	77
Abb. 4.10: VHH-Fc Sekretionsausbeuten aus APO-E und APO-B Expressionskulturen. ....	78
Abb. 4.11: LDS-PAGE und Western-Blot Analyse von Kulturüberständen aus APO-E und APO- B VHH-Fc Expressionskulturen. ....	79
Abb. 4.12: Reinigung von VHH-Fc Fusionsproteinen mittels Protein A- Affinitätschromatographie. ....	81
Abb. 4.13: Analytik zur Reinigung des VHH-Fc Fusionsproteins. ....	82
Abb. 4.14: Analyse der Interaktion von VHH-Fc und hsEGFR – Biolayer-Interferometrie Messprofil (Rohdaten). ....	84
Abb. 4.15: Bindungsanalyse von VHH-Fc und hsEGFR (prozessierte Daten). ....	85
Abb. 4.16: VHH-Fc Glykosylierungsanalyse. ....	87
Abb. 4.17: Klonierungsschema zur Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomänen. ....	90
Abb. 4.18: Aga2p-vermittelte Oberflächenpräsentation von Z- und ZZ-Domäne. ....	91
Abb. 4.19: Durchflusszytometrie und Oberflächenpräsentation von Z- und ZZ-Domäne auf EBY100 Zellen. ....	92

Abb. 4.20 Durchlicht u. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von ZZ-präsentierenden Zellen. ....	94
Abb. 4.21: IgG-Bindung durch Z- und ZZ-Domäne und Durchflusszytometrie. ....	95
Abb. 4.22: Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen. ....	97
Abb. 4.23: Durchlicht u. Fluoreszenz-mikroskopische Analyse von VHH-Fc präsentierenden Zellen. ....	99
Abb. 4.24: Nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen.....	101
Abb. 4.25: Kovalente Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen.....	102
Abb. 4.26: FACS-Analyse der Stabilität der VHH-Fc:ZZ-Interaktion.....	104
Abb. 4.27: VHH-Fc:ZZ Interaktion über einen Zeitraum von 32 Stunden. ....	105
Abb. 4.28: Octet- und FACS-Analysen der Bindung versch. VHH-Fc Fusionsproteine und hsEGFR.....	107
Abb. 4.29: Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Bindung verschiedener VHH-Fc Fusionsproteine (A, B, C) an das Antigen hsEGFR. ....	108
Abb. 4. 30: Experimenteller Ansatz zum Mischungsexperiment 1. ....	110
Abb. 4.31: FACS-Analyse und Sortierung nach zwei MACS-Runden (Mischungsexperiment 1).113	
Abb. 4.32: Analyse der sortierten Klone aus Mischungsexperiment 1. ....	114
Abb. 4.33: 1. FACS-Analyse u. Sortierung nach der MACS-Selektion (Mischungsexperiment 2).118	
Abb. 4.34: 2. FACS-Analyse und Sortierung nach MACS - Mischungsexperiment 2. ....	119
Abb. 4.35: Einzelklonanalyse der Mischung 0,001% nach MACS und FACS. ....	122
Abb. 4.36: Einzelklonanalyse der Mischung 0,0001% nach MACS und FACS. ....	124
Abb. 4.37: FACS-Analyse zur schaltbaren Oberflächenpräsentation. ....	127
Abb. 4.38: Selektiver Wechsel zwischen Oberflächenpräsentation und löslicher Produktion.128	
Abb. 4.39: Analyse zur schaltbaren Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen. ....	129
Abb. 4.40: Klonierungsstrategie der VHH-Bibliotheken.....	131
Abb. 4.41: Analyse von <i>Error-prone</i> und <i>Gap-Repair</i> PCR. ....	132
Abb. 4.42: Sequenzauswertung Bibliothek A.....	134
Abb. 4.43: Amplifizierung der Bibliothek B. ....	135
Abb. 4.44: Sequenzanalyse Bibliothek B. ....	136
Abb. 4.45: Mögliche Rekombinationsereignisse während der Generierung der Bibliothek B.137	
Abb. 4.46: Amplifizierung der Subbibliotheken 1-3 zur Generierung der Bibliothek C. ....	138
Abb. 4.47: Sequenzauswertung der Bibliothek C.....	139
Abb. 4.48: Oberflächenpräsentation und hsEGFR-Bindung der VHH-Bibliotheken A, B und C.141	
Abb. 4.49: Analyse der hsEGFR-Bindung der Bibliotheken.....	142
Abb. 4.50: Zwei-Farben-Markierung und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung der mit mmEGFR markierten VHH-Bibliothek A. ....	146
Abb. 4.51: Sequenzanalyse der selektierten VHH-Varianten.....	148

---

Abb. 4.52: Biolayer-Interferometrie Messung der VHH-Variante 4. ....	150
Abb. 4.53: Biolayer-Interferometrie Messung der parentalen VHH-Domäne.....	150
Abb. 8.1: Proteinsequenzen der ECD von hsEGFR und mmEGFR.....	189

## Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Programm zur Analyse der hsEGFR:VHH-Fc Bindung. ....	52
Tab. 3.2: PCR-Ansatz <i>Gap-Repair</i> . ....	56
Tab. 3.3: 1-Stufen PCR-Programm <i>Gap-Repair</i> . ....	56
Tab. 3.4: 2-Stufen PCR-Programm <i>Gap-Repair</i> . ....	56
Tab. 3.5: PCR-Ansatz zur Analyse von Klonierungsprodukten. ....	57
Tab. 3.6: PCR-Programm zur Analyse von Klonierungsprodukten. ....	57
Tab. 3.7: PCR-Ansatz für die ortspezifische Mutagenese. ....	58
Tab. 3.8: PCR-Programm für die ortspezifische Mutagenese. ....	58
Tab. 3.9: Ansatz für die <i>Error-prone</i> PCR. ....	59
Tab. 3.10: <i>Error-prone</i> PCR-Programm. ....	59
Tab. 3.11: Ligationsansatz für die Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase. ....	61
Tab. 3.12: Ansatz zur TOPO-Blunt Klonierung. ....	62
Tab. 4.1: Kinetische Konstanten der Bindung zwischen VHH-Fc und hsEGFR. ....	86
Tab. 4.2: Kinetische Konstanten der Interaktion der Fc-Bindedomänen mit dem Fc-Teil. ....	89
Tab. 4.3: Kinetische Konstanten der Bindung der VHH-Fc Fusionsproteine (A, B, C) an hsEGFR. ....	107
Tab. 4.4: Mischungsverhältnisse Mischungsexperiment 1. ....	109
Tab. 4.5: Gesamtzellzahlen vor und nach den einzelnen Runden der MACS-Selektion und Abreicherung von Kontrollzellen im Mischungsexperiment 1. ....	111
Tab. 4.6: Gesamtzellzahlen vor und nach der MACS-Selektion und Abreicherung von Kontrollzellen im Mischungsexperiment 2. ....	116
Tab. 8.1: Aminosäurepositionen des Cetuximab Epitops (hsEGFR). ....	190

## Abkürzungsverzeichnis

Aga1p	a-Agglutinin <i>anchoring subunit</i> 1
Aga2p	a-Agglutinin <i>anchoring subunit</i> 2
AGA1	Gen, kodiert für Aga1p
AGA2	Gen, kodiert für Aga2p
AID	<i>Activation induced cytidine deaminase</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
cm	Zentimeter
MFa1p	<i>Mating factor alpha 1 signal peptide</i>
b-	biotinyliert
bzw.	beziehungsweise
D	Dextrose
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECD	Extrazelluläre Domäne ( <i>extracellular domain</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>Epidermal growth factor receptor</i> )
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung ( <i>Fluorescence activated cell sorting</i> )
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>
F(ab') <sub>2</sub>	bivalentes Fab-Fragment
Fc	<i>Fragment crystallizable region</i>
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FR	<i>Framework</i>
Gal	Galaktose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
hs	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
r	<i>Rattus norvegicus</i>
k <sub>a</sub>	Assoziationsrate
Kana	Kanamycin
kb	Kilobase
k <sub>d</sub>	Dissoziationsrate

$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
Konz.	Konzentration
Leu	Leucin
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung ( <i>Magnetic activated cell sorting</i> )
mAu	<i>milli absorbance unit</i>
<i>mean FL</i>	mittlere Fluoreszenz
min	Minute
mm	<i>Mus musculus</i>
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
$Na_2HPO_4$	Di-Natriumhydrogenphosphat
$NaH_2PO_4$	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nanomolar
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PhRMA	<i>Pharmaceutical Research and Manufacturers of America</i>
PMT	Photomultiplier ( <i>Photomultiplier tube</i> )
<i>P. Pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
rel.	relativ
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SA-PE	Streptavidin-R-Phycoerythrin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SpA	<i>S. aureus</i> Protein A
s	Sekunde
Std.	Stunde
T	Zeit
Trp	Tryptophan
u.	und
Upm	Umdrehungen/Minute
Ura	Uracil
versch.	verschieden
VH	variable Region der schweren Kette von Antikörpermolekülen
VHH	variable Region von <i>Heavy-chain</i> Antikörpern
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

---

## 1. Einleitung und Zusammenfassung

---

Mit großem Aufwand suchen heutzutage Pharmakonzerne, Biotechnologieunternehmen und akademische Einrichtungen mit verschiedensten Methoden nach neuen Wirkmolekülen für den therapeutischen Einsatz. Überwiegend werden dazu phänotypische Durchmusterungen und Zielstruktur-basierte, sogenannte *Target*-basierte Methoden, verwendet<sup>1</sup>.

Enormen Einfluss auf die Wirkstofffindung hatte die Entschlüsselung des menschlichen Genoms seit Mitte der 1990er Jahre, wodurch neue Einblicke in den Entstehungsmechanismus diverser Krankheiten erlangt wurden. Dadurch wurden bis dato unbekannte Krankheits-assoziierte Gene identifiziert, die zur Validierung neuer Zielstrukturen für die Wirkstofffindung führten<sup>2-4</sup>. Von 1950 bis zum Jahr 2008 wurden insgesamt 1222 neuartige Wirkstoffe, sogenannte NMEs (*New Molecular Entities*) von der US-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA zugelassen. Davon waren 119 rekombinante Proteine und monoklonale Antikörper, sogenannte *Biologics*<sup>5</sup>.

Seit Mitte der 1990er Jahre begann die Produktivität in der Wirkstofffindung des Pharmasektors nachzulassen, während die Kosten im Bereich Forschung und Entwicklung bereits seit den 1950er Jahren exponentiell angestiegen sind<sup>6</sup>. Diese Entwicklung ist von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren wirtschaftlicher und wissenschaftlicher Natur geprägt, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll<sup>7</sup>. Nennenswert in diesem Zusammenhang ist jedoch der Umstand, dass Schlüsseltechnologien zur Wirkstofffindung wie die des *Phage Display* oder *Yeast Surface Display* patentiert und der Zugang zu diesen und ihre Verwendung daher kostenpflichtig ist<sup>8</sup>. Um der abnehmenden Produktivität entgegenzuwirken, ist es notwendig, den Prozess der Wirkstofffindung effizienter zu gestalten. Ein Ansatz dazu ist die Entwicklung und der Einsatz neuer Technologien.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer Technologie im Prozess der Wirkstofffindung. Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Prüfung einer Methode zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von Antikörpern und abgeleiteten Fragmenten sowie darauf basierenden Molekülbibliotheken auf der Oberfläche von *S. cerevisiae* Zellen. Die nicht-kovalente Weise der Oberflächenpräsentation soll die Selektion von spezifischen Varianten mittels Hochdurchsatz-Durchmusterung und die nachfolgende schaltbare Sekretion des selektierten Bindemoleküls in den Kulturüberstand zur biochemischen Charakterisierung ermöglichen.

Im Mittelpunkt stand die erfolgreiche Kombination von Selektion und Produktion mit dem zeitersparenden Verzicht von Subklonierungen und Reformatierungsschritten, wie es bei vergleichbaren Methoden wie z.B. der Oberflächenpräsentation von Proteinen auf Phagen nötig ist<sup>9</sup>. Durch diese Kombination kommt es zur Vereinfachung und Beschleunigung von sich anschließenden Prozessen in der Wirkstofffindung<sup>10</sup>. Durch die Verwendung einer Fc-Bindedomäne als Vermittler der Oberflächenpräsentation konnten nicht nur VHH-Fc-Fusionsproteine (bestehend aus zwei Proteinketten), sondern auch komplexere Proteine wie hochmolekulare IgG-Moleküle (bestehend aus vier Proteinketten) erfolgreich auf Hefezellen präsentiert werden. Durch die Verwendung der Hefe *S. cerevisiae* als Wirtsorganismus wird bereits während der Oberflächenpräsentation auf korrekte Faltung, Sekretion und Stabilität des Proteins selektiert, da die Hefe als Eukaryot über Mechanismen zur Qualitätskontrolle bei der Proteinsynthese verfügt<sup>11</sup>. Durch das hier dargestellte Verfahren ist es möglich, VHH-Fc-Fusionsproteine und komplexere Proteine in ihrem finalen anwendungsspezifischen Format auf der Oberfläche von Hefezellen zu präsentieren, und so Methoden des Protein-*Engineerings* anwenden zu können. Im Anschluss kann der selektierte Klon direkt zur Produktion des Proteins verwendet werden.

In dem sich anschließenden Abschnitt (Kapitel 1.1) wird zunächst ein kurzer Überblick über den Prozess der Wirkstofffindung gegeben; sodann werden weiterführend in Kapitel 1.2 wichtige Wirkstoffklassen erläutert. Daran anschließend ist in Kapitel 1.3 eine Übersicht über die Struktur und Funktion von Antikörpern und die Herstellung und Verwendung rekombinanter Antikörper-Fragmente (Kapitel 1.3.1) gegeben. Kapitel 1.3.2 erläutert die Vorzüge von *cameliden* VHH-Domänen. In Kapitel 1.4 werden die Eigenschaften des bakteriellen Oberflächenproteins SpA (Protein A) in Bezug auf die Bindung von IgG-Molekülen erläutert. In Kapitel 1.5 folgt dann eine Einführung in die Thematik des Antikörper-*Engineering* und daran schließt sich in Kapitel 1.6 ein kurzer Überblick über die Oberflächenpräsentation und Durchmusterung von Molekülbibliotheken an. Dieser Abschnitt leitet zu Kapitel 1.7 über, in welchem die Oberflächenpräsentation auf Hefezellen und speziell das a-Agglutinin System in Kapitel 1.8 erläutert wird. Anschließend wird die Verwendung von Hefe als Expressionssystem in Kapitel 1.9 besprochen und speziell die Expression von Antikörpern und Antikörper-Fragmenten in *Saccharomyces cerevisiae* in Kapitel 1.10 beschrieben.



---

## 1.1 Der Prozess der Wirkstofffindung

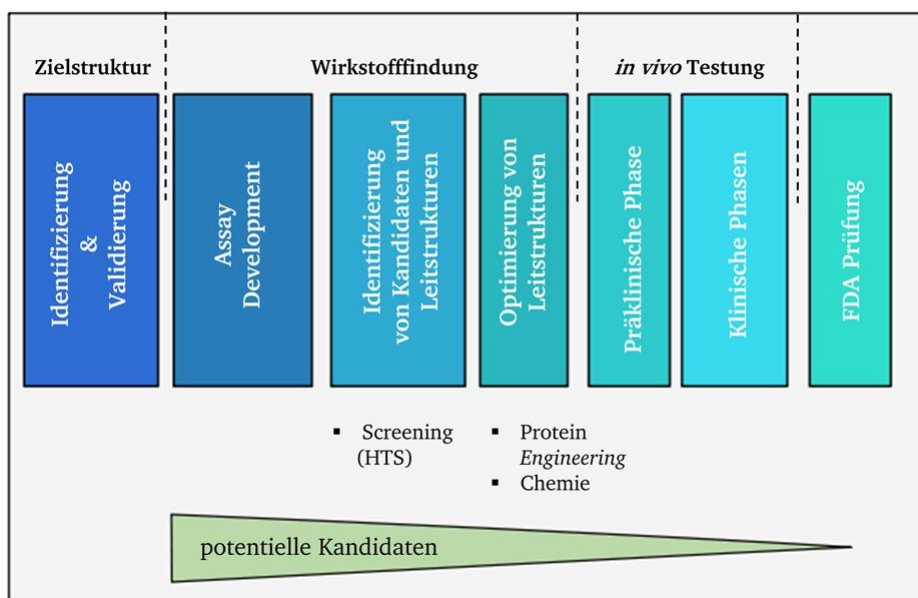
---

In der Phase der Wirkstofffindung werden Wirkstoffkandidaten identifiziert, die das Potential bieten, zu einem Medikament weiterentwickelt zu werden. Am Anfang dieses Prozesses steht die Identifizierung einer zellulären oder extrazellulären Zielstruktur, die in Verbindung mit einer Erkrankung steht. Bei dieser Zielstruktur, die „*Target*“ genannt wird, handelt es sich in der Regel um ein Molekül, das in der Pathologie der Erkrankung eine zentrale Rolle einnimmt. Dies können sezernierte Proteinfaktoren, Oberflächenrezeptoren auf Zellen oder Teilstücke von intrazellulären Signalwegen sein. Während der Phase der *Target*-Validierung wird gezeigt, dass diese Zielstruktur eine signifikante Rolle in der Entwicklung und Manifestierung der Krankheit hat und dass der therapeutische Eingriff mit eventuellen Wirkstoffen einen Effekt auf die Pathologie hat. Man spricht in diesem Zusammenhang von einem „*drugable Target*“<sup>12</sup>. Hier sei beispielhaft die Rezeptortyrosinkinase EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) genannt<sup>13</sup>. Es wurde beobachtet, dass die Aktivierung von EGFR in Tumoren in einer stimulierten Proliferation, Angiogenese und Metastasierung des Tumors resultierte und dass Tumorzellen zusätzlich vor Apoptose geschützt wurden<sup>14</sup>. Durch EGFR-bindende monoklonale Antikörper konnte die EGFR-induzierte Zellproliferation unterbunden werden<sup>15, 16</sup>. Auf klinischer Seite wurde zudem beobachtet, dass viele Tumorarten EGFR stark überexprimieren<sup>17</sup>. Die aufgelisteten Punkte rechtfertigen die Validierung von EGFR als molekulare Zielstruktur, *drug Target*<sup>18</sup>, für die Wirkstofffindung. Nach Identifizierung und Validierung der *Target*-Struktur wird mit verschiedenen Methoden nach Wirkstoffkandidaten gesucht. Prinzipiell lassen sich hier zwei unterschiedliche Methoden gegenüberstellen. Mittels Hochdurchsatz-Methoden (*HTS: high throughput screening*) werden große Serien an Wirkstoffkandidaten untersucht und schnell potentielle Kandidaten identifiziert. Dies wird durch spezielle Analysen erreicht, in denen Bindungsverhalten und Aktivität aller Kandidaten untersucht werden. Diese spezifischen Analysen werden zuvor im Schritt „*Assay Development*“ entwickelt.

Durch rationales Design lassen sich auf einem anderen Weg Wirkstoffkandidaten entwickeln. Zu Beginn wird hier die molekulare Struktur der Zielstruktur bestimmt, denn der Ausgangspunkt für struktur- und computergestützte Ansätze ist die dreidimensionale Struktur des *Target*-Moleküls.

Die identifizierten Wirkstoffkandidaten mit therapeutischem Potential werden *Hits* genannt. Zeigen einige dieser *Hits* besonders erwünschte pharmakokinetische Eigenschaften, werden sie als Leitstrukturen oder *Lead*-Moleküle bezeichnet. Diese Leitstrukturen werden im

Anschluss durch Protein-Engineering und kombinatorische Chemie weiter optimiert. Aus durchschnittlich 5.000 bis 10.000 *Hits* in dieser ersten Phase der Wirkstofffindung und Wirkstoffentwicklung erreichen ca. 250 Kandidaten die präklinische Phase und lediglich ca. 5 Kandidaten treten in die klinische Phase ein. Nach der klinischen Phase erhält durchschnittlich ein Wirkstoff die Marktzulassung durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA. Einen schematischen Überblick über diesen Prozess zeigt Abb. 1.1.



**Abb. 1.1: Der Prozess der Wirkstofffindung.**

Vereinfachte, schematische Darstellung des Prozesses der Wirkstoffentwicklung. Modifiziert nach PhRMA ([www.innovation.org](http://www.innovation.org))<sup>19</sup>.

## 1.2 Wirkstoffklassen

Am Beispiel der zielgerichteten Krebstherapie sollen exemplarisch zwei wichtige Wirkstoffklassen erläutert werden, die als Zielstruktur die Rezeptortyrosinkinase EGFR haben. Es wird zwischen kleinen Molekülen (*Small Molecules*) und großen Biomolekülen (*Biologics*) unterschieden. Von beiden Klassen existieren zugelassene Wirkstoffe. In der Kategorie der *Small Molecules* sind die Wirkstoffe Gefitinib und Erlotinib<sup>20</sup> und in der Kategorie der *Biologics* ist der monoklonale Antikörper Cetuximab für die EGFR-basierte Krebstherapie verfügbar. *Biologics* und *Small Molecules* zeigen deutliche pharmakologische Unterschiede. Monoklonale Antikörper (wie Cetuximab), als beispielhafte Vertreter der *Biologics*, sind große Moleküle (150 kDa), die intravenös verabreicht werden müssen, während *Small Molecules* (500 Da) in oral verabreichbarer Form verfügbar sind. Durch die Unterschiede in den Molekülgrößen ergeben sich grundverschiedene Verhaltensweisen der Moleküle in Bezug auf Tumor-

penetration und Pharmakokinetik. Durch das hohe Molekulargewicht zeigen monoklonale Antikörper einerseits eine weniger effiziente Tumorpenetration als kleine Moleküle<sup>9, 21</sup>. Andererseits ist aufgrund des hohen Molekulargewichts von monoklonalen Antikörper die Serumhalbwertszeit jedoch deutlich höher als die von kleinen Molekülen. Bedingt ist das durch die Ausschlussgröße der renalen Filtration und den FcRn-vermittelten Recycling-mechanismus von Antikörpermolekülen<sup>22</sup>. Dadurch ist das Zeitintervall zwischen zwei Applikationen des monoklonalen Antikörpers innerhalb einer Therapie im Vergleich zu kleinen Molekülen deutlich länger, wodurch ein verbessertes pharmakodynamisches Wirkprofil erreicht wird.

Ein weiterer Unterschied besteht in der Wirkungsweise und dem Zielort beider Molekülklassen. Monoklonale Antikörper können aufgrund ihrer bereits erwähnten Größe Zellmembranen nicht durchdringen und deshalb primär nur an Oberflächenrezeptoren auf Zellen binden und wirken oder mit sezernierten Faktoren interagieren<sup>23</sup>. Sie zeigen eine hohe Zielstrukturspezifität und -affinität. Durch die Bindung des Antikörpers Cetuximab an EGFR wird z.B. die Liganden-induzierte Aktivierung durch den natürlichen Liganden EGF (*Epidermal growth factor*) des Rezeptors verhindert<sup>14, 24</sup>. Bei kleinen Molekülen hingegen handelt es sich meist um Tyrosinkinaseinhibitoren, die ATP kompetitieren und so die Kinaseaktivität von EGFR inhibieren<sup>25</sup>. Aufgrund ihrer geringen Molekülgröße ist es ihnen möglich, mit intrazellulären Zielstrukturen zu interagieren, da sie Zellmembranen durchqueren können. Diese Eigenschaft ermöglicht auch ihre bereits erwähnte orale Bioverfügbarkeit. Meist zeigen sie eine deutlich geringere Spezifität für die Zielstruktur als monoklonale Antikörper<sup>26</sup>. Durch unerwünschte Wechselwirkungen ist in diesem Fall die Toxizität meist erhöht, in der Literatur wird dadurch auf die Möglichkeit zur kreuzspezifischen Reaktivität verwiesen<sup>26</sup>.

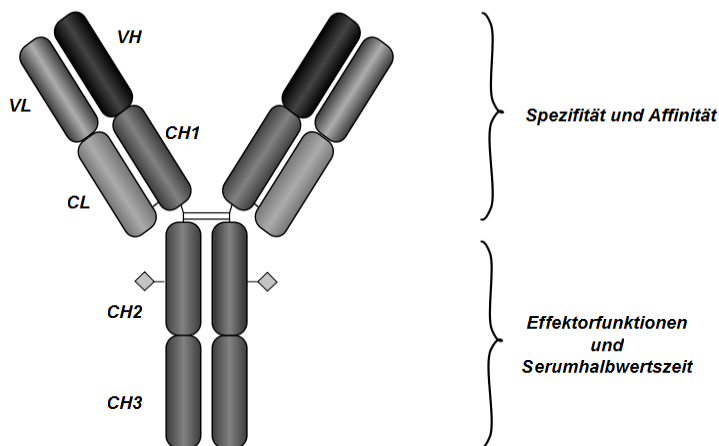
Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen kleinen Molekülen und monoklonalen Antikörpern besteht in ihrer Wirkung auf das Immunsystem. Der Wirkmechanismus kleiner Moleküle ist nicht an das Immunsystem gebunden, während sich monoklonale Antikörper weitere Faktoren des Immunsystems zunutze machen. Ihr Wirkmechanismus ist nicht nur auf ihre Fähigkeit, mit einer Zielstruktur zu interagieren, beschränkt. Durch ihnen immanente Strukturen werden weitere anti-Tumoreffekte wie ADCC (*Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) und CDC (*Complement-dependent cytotoxicity*) aktiviert, die zusätzlich zur Bekämpfung des Tumors beitragen<sup>27, 28</sup>. Im Folgenden wird auf Wirkstoffkategorie der monoklonalen Antikörper näher eingegangen.

### 1.3 Struktur und Funktion von Antikörpern

Antikörper-Moleküle tragen nicht nur zur Immunantwort und Pathogenabwehr unter natürlichen Bedingungen im Organismus bei, sie haben seit Ende der 1980er Jahre auch große Bedeutung in Diagnostik und Medizin erlangt. Bereits in der Mitte des letzten Jahrhunderts wurden Antikörper-Moleküle eingesetzt, um z.B. den Insulinspiegel im menschlichen Plasma zu bestimmen<sup>29</sup>. Aufgrund ihrer Fähigkeit, hochspezifisch und hochaffin verschiedenste Proteine zu binden, war es naheliegend, sie für diagnostische und therapeutische Ansätze einzusetzen. In der biochemischen Analytik sind Antikörper bereits nicht mehr wegzudenken, da viele Nachweismethoden im Labor auf der Interaktion zwischen Antikörper und Antigen basieren, wie zum Beispiel Western-Blot Analysen, Immoprecipitation und ELISA<sup>30,31</sup>.

IgG-Moleküle führen unter natürlichen Bedingungen im Organismus zwei wesentliche Funktionen aus. Zum einen wird das Antigenmolekül (Pathogen) spezifisch durch den Antikörper gebunden, welches im Organismus die Immunantwort induziert, zum anderen wird durch den gebundenen Antikörper eine begrenzte Zahl von Immun-Effektorzellen rekrutiert. Beide Funktionen sind strukturell voneinander getrennt und durch den modularen Aufbau des IgG-Moleküls festgelegt (Abb. 1.2). Ein IgG-Molekül ist ein Glykoprotein und besteht aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 1.2)<sup>32</sup>. Die Antigenbindung des Antikörpers erfolgt über die variable Region des Fab-Fragments, die sich aus den aminoterminalen Bereichen der schweren und leichten Ketten zusammensetzt. Sie bilden das Paratop, welches spezifisch für ein definiertes Epitop des Antigens ist<sup>32</sup>. Die variable Region setzt sich aus den variablen Domänen der leichten und schweren Ketten zusammen (VL und VH). Ihre Aminosäuresequenz variiert stark zwischen IgG-Molekülen verschiedener Spezifität. Allerdings ist diese Variabilität nicht gleichmäßig über die gesamte variablen Region verteilt, sondern konzentriert sich auf spezielle Segmente, die hypervariablen Bereiche. Die hypervariablen Bereiche formen Schleifenstrukturen, die durch die spezielle Faltung der variablen Region nach Außen exponiert sind. Diese Bereiche werden CDRs (*complementarity determining regions*) genannt, von welchen jeweils drei pro leichter und schwerer Kette zu finden sind<sup>33</sup>. Stabilisiert wird diese Struktur durch sogenannte *Framework*-Bereiche zwischen den CDR-Schleifen. Durch die Paarung der leichten und schweren Kette kommt es demzufolge zur Zusammenlagerung der sechs hypervariablen Bereiche, welche anschließend zusammen

die sogenannte „Antigen-combining site“ bilden und die Spezifität des IgG-Moleküls determinieren.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines IgG-Moleküls.**

Schematisch dargestellt ist die Domänenstruktur eines IgG-Moleküls, bestehend aus zwei identischen schweren Ketten (dunkelgrau) und zwei identischen leichten Ketten (hellgrau). Der modulare Aufbau des IgG-Moleküls bewirkt die strukturelle Trennung der IgG-Eigenschaften wie Spezifität/Affinität und Effektorfunktionen/Serumhalbwertszeit. VH: variable Region der schweren IgG-Kette, VL: variable Region der leichten IgG-Kette, CH1, CH2, CH3: konstante Bereiche der schweren IgG-Kette, CL: konstanter Bereich der leichten IgG-Kette. ◆: Glykosylierung

Während das Fab-Fragment wie beschrieben für die Antigen-Erkennung und -Bindung zuständig ist, verbindet der Fc-Teil des IgG-Moleküls den Antikörper mit dem Immunsystem<sup>32</sup>. Er wird durch die konstanten Regionen der schweren Ketten gebildet und zeigt identische Aminosäuresequenzen bei verschiedenen IgG-Molekülen desselben Isotyps. Der Fc-Bereich (CH2 und CH3) erfüllt drei unterschiedliche Aufgaben. Zum einen binden Fc $\gamma$ -Rezeptoren, die von verschiedenen Immun-Effektorzellen exprimiert werden, an diesen Bereich. Dadurch werden z.B. Makrophagen oder neutrophile Zellen rekrutiert<sup>28, 34</sup>. Daneben binden Komplementfaktoren an den Fc-Bereich, wodurch der Start der Komplement-Kaskade initiiert wird<sup>35, 36</sup>. Zudem wird die ungewöhnlich lange Serumhalbwertszeit von IgG-Molekülen, zusätzlich zur Ausschlussgröße der renalen Filtration<sup>33</sup>, auch über den Fc-Bereich gesteuert, da dort der membranständige Fc-Rezeptor FcRn (neonataler Fc-Rezeptor) bindet. Er wird größtenteils von Zellen des Gefäßendothels exprimiert und schützt IgG-Moleküle, die einen Großteil der Serumproteine ausmachen, durch einen Recycling-Mechanismus vor deren katabolem Abbau<sup>22</sup>. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist ebenfalls die Fähigkeit dieses Rezeptors, IgG-Moleküle durch die Plazenta zu transportieren, um so dem Fötus Teile des mütterlichen Immunsystems zu Verfügung zu stellen und eine kurzfristige passive Immunität zu gewährleisten<sup>37</sup>.

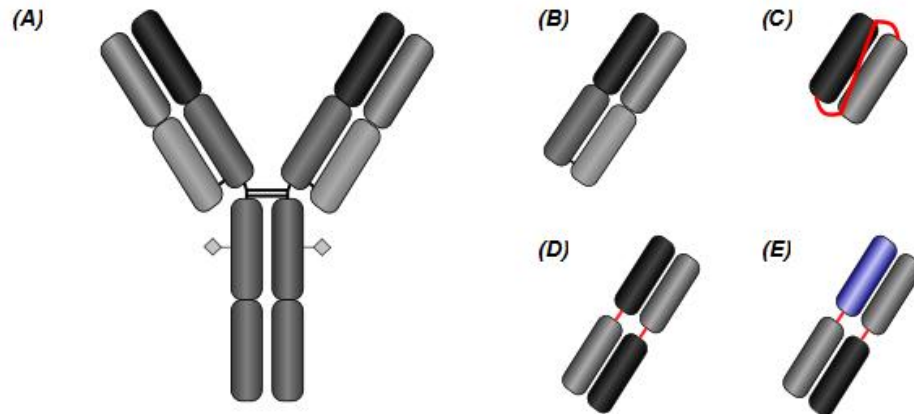
### 1.3.1 Rekombinante Antikörper-Fragmente

Durch die von Köhler und Milstein entwickelte Hybridomtechnologie ist es seit Mitte der 1970er Jahre möglich, monoklonale Antikörper herzustellen. Dabei werden Antikörper-produzierende B-Zellklone mit Myelomzellen fusioniert. Die daraus entstehenden Hybridzellen, die sogenannten Hybridome, sind unsterblich und produzieren dauerhaft monoklonale Antikörper-Moleküle<sup>38</sup>.

Da die zellbiologischen Methoden zur Erzeugung von Hybridomen, wie Immunisierung, Zellfusion und Klonselktion, sehr aufwendig und kostenintensiv sind und die Produktion von IgG-Molekülen größtenteils in komplexen Säuger-Zellsystemen stattfindet<sup>39</sup>, ist die Verwendung rekombinanter Antikörper-Fragmente in anderen Formaten interessant. Diese können meist kostengünstiger und weniger zeitintensiv in mikrobiellen Systemen wie *E. coli* hergestellt werden<sup>40</sup>. Ebenfalls eröffnen sich durch diese neuen Antikörper-Formate neue Anwendungsgebiete in Therapie und Diagnostik, wenn z.B. Effektorfunktionen nicht erwünscht sind oder kurze Eliminierungsraten aus dem Organismus präferiert werden. Besonders vor dem Hintergrund, dass solide Tumore 85% der humanen Krebserkrankungen ausmachen<sup>9</sup>, wird die Verwendung rekombinanter Antikörper-Fragmente mit geringeren Molekulargewichten aufgrund ihrer verbesserten Tumorpenetration intensiv erforscht<sup>41</sup>. Ihnen ist es möglich, weit tiefer in das Tumorgewebe vorzudringen als hochmolekulare IgG-Moleküle<sup>33, 42</sup>. Weit verbreitete Formate sind z.B. scFv-Fragmente<sup>43</sup> oder Fragmente aus einzelnen Binde-Domänen wie z.B. VHH-Domänen<sup>44, 45</sup>. Durch Proteolyse mit der Protease Papain wird ein IgG-Molekül in drei Fragmente zerlegt. Papain schneidet das Molekül an der flexiblen *Hinge*-Region, wodurch zwei Antigen-bindende Fab-Fragmente (*Fragment antigen-binding*) und ein Fc-Fragment (*Fragment crystallizable region*) entstehen, welches nicht an das Antigen bindet<sup>32</sup> (Abb. 1.3).

Durch rekombinante DNA-Technologie ist es möglich, eine große Vielfalt weiterer Formate zu erzeugen. Fv-Fragmente sind die kleinsten Fragmente eines Antikörpers, die noch zur Antigenbindung fähig sind, da sie nur noch aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette bestehen. Sie werden nicht durch Proteolyse, sondern ausschließlich durch rekombinante DNA-Technologie gewonnen. Die dimere Proteinstruktur des Fv-Fragmentes ist jedoch nicht ausreichend stabil, da zwischen schwerer und leichter Kette keine kovalente Verbindung besteht<sup>9</sup>. Durch die Verwendung eines artifiziellen Peptidlinkers werden VH- und VL-Domänen erfolgreich zu scFv-Fragmenten verbunden. Bei diesen handelt es sich um monovalente Fragmente; sie weisen eine Bindestelle für ein Antigen-Molekül auf. Es gibt aber

auch Strategien zur Generierung bivalenter und bispezifischer Formate, die erfolgreich durch die Reduktion des Peptidlinkers hergestellt werden<sup>46, 47</sup>. Abb. 1.3 zeigt eine Auswahl gängiger Antikörper-Fragmente.



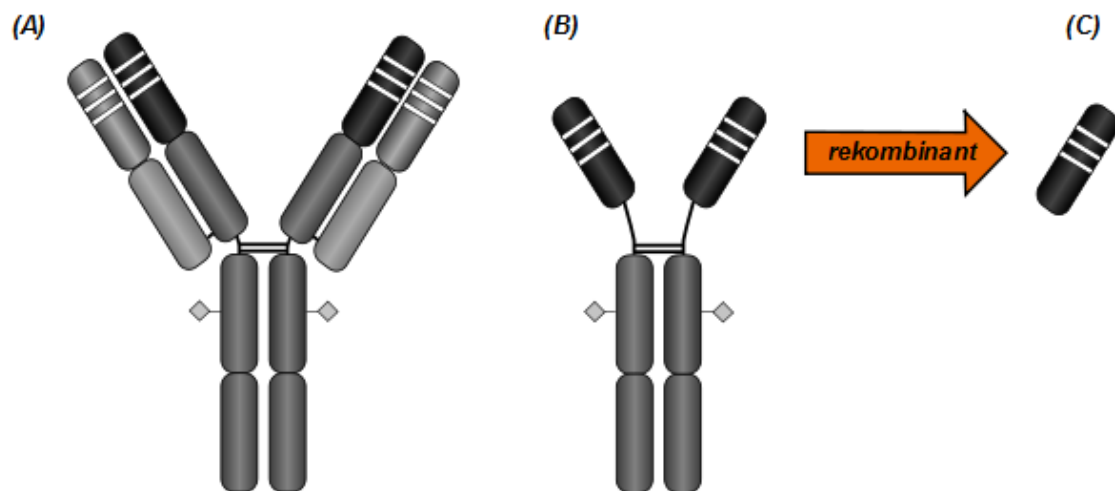
**Abb. 1.3: Rekombinante Antikörper-Fragmente.**

Gezeigt sind ein bivalentes IgG-Molekül aus zwei identischen schweren Ketten (dunkelgrau) und zwei identischen leichten Ketten (hellgrau) (A), ein monovalentes Fab-Fragment (B) und ein rekombinantes, monovalentes scFv-Fragment (C). scFv-Dimere (Diabodies) eröffnen die Möglichkeit, bivalente (D) oder bispezifische (E) Formate zu generieren. ◆: Glykosylierung.

### 1.3.2 Camelidae VHH-Fragmente

*Camelidae* weisen ein für Vertebraten ungewöhnliches Antikörpersortiment auf. Neben konventionellen IgG-Molekülen besitzen sie auch solche, die nur aus schweren Ketten aufgebaut sind. Sie werden als Schwere-Ketten-Antikörper oder *Heavy-Chain*-Antikörper bezeichnet<sup>48-50</sup>. Ihnen fehlt neben der leichten Kette auch die CH1 Region der schweren Kette. Bei *Heavy-Chain*-Antikörpern ist die Antigen-bindende Region direkt über die *Hinge*-Region mit dem Fc-Teil des Antikörpers verbunden<sup>42</sup>. Dementsprechend weisen sie nur drei CDRs pro Valenz auf, während konventionelle IgG-Moleküle sechs CDRs pro Valenz besitzen (Abb. 1.4). Infolgedessen zeichnen sich *Heavy-Chain*-Antikörper im Vergleich zu IgG-Molekülen durch eine geringere Molekülgröße aus. Während bei konventionellen IgG-Molekülen die Antigen-Bindungsstelle durch ein Zusammenspiel von leichter und schwerer Kette der Fab-Region gebildet wird, erfolgt die Antigen-Bindung bei *Heavy-Chain*-Antikörpern nur über eine einzelne Domäne. Diese Antigen-bindende Domäne wird bei cameliden als VHH bezeichnet und kann ausschließlich mittels rekombinanter DNA-Technologie gewonnen werden<sup>50</sup>. Analog dazu wurden vergleichbare *Heavy-Chain*-Antikörper auch bei einigen Haiarten identifiziert; sie werden als IgNAR bezeichnet<sup>51</sup>. Entsprechend wird die Antigen-bindende Domäne VNAR genannt<sup>45</sup>.





**Abb. 1.4: Antikörperrepertoire der *Camelidae*.**

Neben konventionellen IgG-Molekülen, die aus zwei identischen schweren Ketten (dunkelgrau) und zwei identischen leichten Ketten (hellgrau) aufgebaut sind **(A)**, treten auch sogenannte *Heavy-Chain*-Antikörper **(B)** auf. Sie sind durch das Fehlen der CH1-Region und der leichten Ketten gekennzeichnet. Durch rekombinante DNA-Technologie (Klonierung und Expression in Bakterien oder Hefezellen) können aus *Heavy-Chain*-Antikörpern VHH-Domänen **(C)** gewonnen werden. ◇: Glykosylierung. Weiße Markierungen repräsentieren die CDRs. (Modifiziert nach De 2006<sup>50</sup>).

Der VHH-Domäne werden in der Literatur einige Besonderheiten zugesprochen und durch den Vergleich mit humanen VH-Domänen kann eine Qualifizierung der VHH-Eigenschaften vorgenommen werden. Es wird angenommen, dass das Fehlen der leichten Ketten in *Heavy-Chain*-Antikörpern durch eine Verlängerung der CDR3 kompensiert wird<sup>52</sup>, da im Vergleich zu konventionellen IgG-Molekülen in einer VHH-Domäne nur noch drei CDRs die Antigen-Bindung vermitteln. Zur Veranschaulichung: Die CDR3 der VH-Region von humanen IgG-Molekülen umfasst durchschnittlich neun bis zwölf Aminosäurereste<sup>52</sup>, während die CDR3 von VHH-Domänen eine durchschnittliche Länge von 16 bis 18 Aminosäureresten aufweist<sup>52-54</sup>. Diese CDR3 ist strukturell komplexer und wird teilweise durch zusätzliche Disulfidverbrückungen mit der CDR1 oder CDR2 stabilisiert<sup>49</sup> (Abb. 1.5). Durch typische Aminosäuresubstitutionen in *Framework* 1 und *Framework* 2 erreichen VHH-Domänen eine enorme Hydrophilität<sup>55</sup>. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, dass keine Paarung mit einer leichten Kette erforderlich ist. In IgG-Molekülen werden leichte und schwere Ketten neben einer Disulfidbrücke zwischen CL und CH1-Region über hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten<sup>56</sup>. Abb. 1.5 zeigt schematisch den strukturellen Vergleich einer cameliden VHH-Domäne mit einer humanen VH-Domäne.



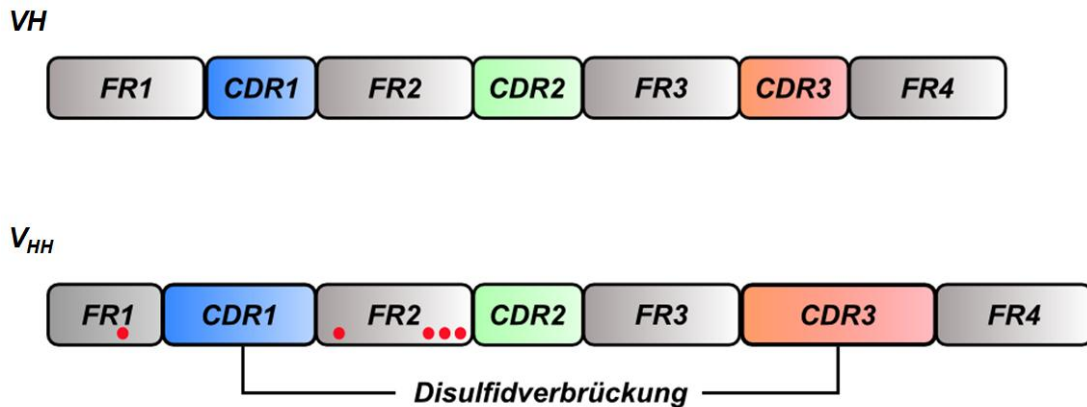


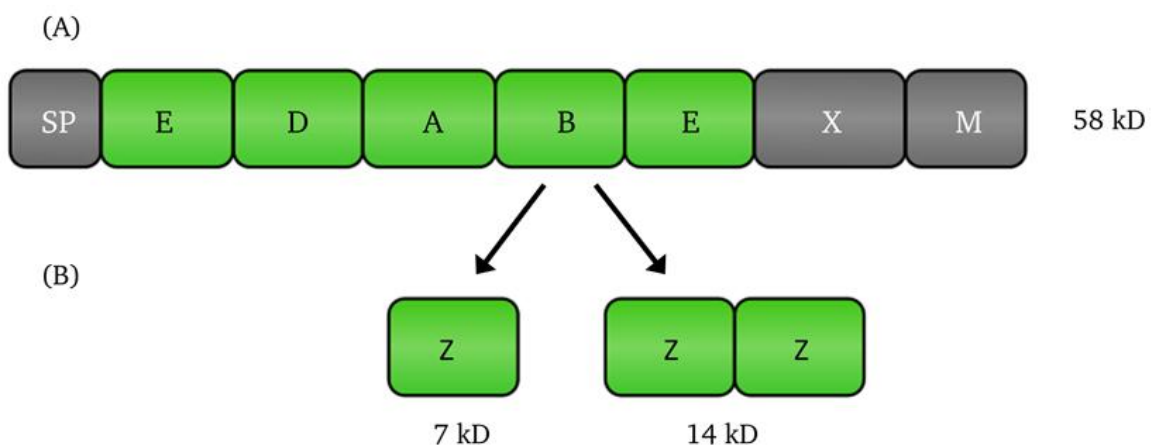
Abb. 1.5: Vergleich einer humanen  $V_H$ -Domäne und einer cameliden  $V_{HH}$ -Domäne.

Stark vereinfachte strukturelle Darstellung von humanen  $V_H$ - und cameliden  $V_{HH}$ -Sequenzen. Dargestellt sind die Gerüstregionen (FR: *Framework regions*) und die Bereiche der CDRs (farbig). Die Positionen von  $V_{HH}$ -typischen hydrophilen Aminosäuresubstitutionen in *Framework* 1 ( $FR1$ ) und *Framework* 2 ( $FR2$ ) sind als rote Punkte angedeutet. Die in  $V_{HH}$ -Domänen häufig vorhandene Disulfidverbrückung von  $CDR1$  und  $CDR3$  ist als schwarze Linie gekennzeichnet. (Modifiziert nach Muyldermans 2001<sup>49</sup>).

Durch die bereits erwähnte verlängerte  $CDR3$  ergeben sich oft konvexe Paratop-Formen, die gut geeignet sind, in tiefe Spalten einzudringen. Dadurch ist es  $V_{HH}$ -Domänen möglich, in Strukturen einzudringen, die für konventionelle Antikörper-Fragmente, wie z.B. Fab-Fragmente, unzugänglich sind, da diese oft konkave Paratop-Formen bilden<sup>49, 57, 58</sup>. Aufgrund ihrer einkettigen Struktur wird angenommen, dass sich  $V_{HH}$ -Domänen nach Denaturierung leichter als andere Antikörper-Fragmente wieder funktionell zurückfalten<sup>59</sup>. Dies ist ein weiteres Indiz für die enorme Strukturstabilität dieser Domäne, die nicht auf Faltungshelfer angewiesen ist. Eine weitere Eigenschaft, die  $V_{HH}$ -Domänen mit anderen rekombinanten Antikörper-Fragmenten geringer Größe teilen, ist die durch ihre reduzierte Größe verbesserte Gewebepenetration im Vergleich zu hoch-molekularen IgG-Molekülen<sup>49, 60</sup>.

## 1.4 *Staphylococcus aureus* Protein A

Auf der Oberfläche von Bakterien befinden sich unter anderem Proteine, die hoch-affin an Immunglobuline binden können<sup>61</sup>. Sie unterscheiden sich in ihrer Spezifität bezüglich der Wirtsspezies und der Immunglobulinklassen, die sie binden können. Bei den Bakterien handelt es sich vorwiegend um pathogene Vertreter der Gattungen *Staphylococcus* und *Streptococcus*. Die biologische Funktion der Oberflächenproteine besteht in der Maskierung der bakteriellen Zelle mit Wirts-eigenen Proteinen, um dem Immunsystem des Wirts zu entgehen<sup>62</sup>. Eines der bekanntesten Immunglobulin-bindenden bakteriellen Oberflächenproteine ist das *Staphylococcus aureus* Protein A, SpA genannt. Es findet biotechnologisch Anwendung zur Affinitätsreinigung von IgG-Molekülen und Fc-Fusionsproteinen und setzt sich aus fünf Domänen zusammen, die alle zur IgG-Bindung beitragen und auch einzeln noch IgG-bindende Eigenschaften besitzen<sup>63</sup>. Die Bindung von IgG-Molekülen findet hauptsächlich über den Fc-Teil statt. Des Weiteren ist die Bindung von SpA an Fab-Fragmenten gezeigt worden<sup>64</sup>. Die Domänenstruktur von SpA ist in Abb. 1.6 gezeigt<sup>65</sup>. Zusätzlich zu den fünf stark sequenzhomologen Domänen (E, D, A, B und E) finden sich noch zwei weitere Domänen (X und M), die die Verankerung von SpA in der bakteriellen Zellwand vermitteln, und ein N-terminales Signalpeptid (SP), das SpA zur Zellwand navigiert.



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung von *S. aureus* SpA und SpA-abgeleiteten Domänen.**

In (A) ist die Domänenstruktur von Protein A (SpA) gezeigt. Diese baut sich aus fünf IgG-bindenden Domänen (E, D, A, B, E), einer Signalsequenz (SP) und zwei Domänen (X und M) zur Verankerung von SpA in der bakteriellen Zellwand auf. (B) zeigt die von Domäne B abgeleitete und durch rekombinante DNA-Technologie gewonnene artifizielle Z-Domäne. Die ZZ-Domäne wird durch Duplizierung der Z-Sequenz hergestellt. (Modifiziert nach Boström,T., Nilvebrant,J., Honer,S. 2012<sup>61</sup>)

Die Bindung von SpA an Fc-Teile ist pH-abhängig<sup>61</sup>. Die stärkste Bindung liegt bei einem pH-Wert von 8 vor<sup>66</sup>. Wie bereits erwähnt können die Domänen E, D, A, B und E auch einzeln die Bindung an Fc-Teile und Fab-Fragmente vermitteln. Dadurch ergeben sich Vorteile insbesondere bezüglich der biotechnologischen Verwendung dieser Domänen. Auf Grund der im Vergleich zu SpA geringeren Größe ist die rekombinante Herstellung der einzelnen Domänen gegenüber SpA vereinfacht. Von Domäne B leitet sich eine artifizielle Domäne ab, die 1987 durch eine Aminosäuresubstitution an Position 29 von Nilsson und Mitarbeitern generiert wurde<sup>67</sup>. Sie wird Z-Domäne genannt und zeigt eine erhöhte chemische Stabilität. Zusätzlich wurde durch die erwähnte Aminosäuresubstitution ein Verlust der Bindung der Z-Domäne an Fab-Fragmente erreicht. Dadurch bindet die Z-Domäne ausschließlich über den Fc-Teil das IgG-Moleküle<sup>68</sup>. Wie Domäne B nimmt auch die Z-Domäne eine Struktur aus drei  $\alpha$ -Helices ein<sup>69, 70</sup>. Durch die Verwendung einer duplizierten Z-Sequenz (ZZ-Domäne) wird eine stärkere Bindung der ZZ-Domäne im Vergleich zur Z-Domäne für Fc-Teile erreicht. Die ZZ-Domäne ist ein divalentes Molekül wodurch die Fc-Bindung durch einen Aviditätseffekt im Vergleich zur monovalenten Z-Domäne verstärkt wird<sup>71</sup>.

---

## 1.5 Antikörper-Engineering

---

Im Jahr 1986 erhielt der erste monoklonale Antikörper für Therapie Zwecke die Marktzulassung. Bei diesem therapeutischen Antikörper handelt es sich um einen murinen CD3-bindenden Antikörper (OKT3<sup>®</sup>), der zur Immunsuppression bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eingesetzt wurde<sup>72</sup>. Die Verabreichung dieses Antikörpers führte allerdings zur Bildung von humanen anti-Maus-Antikörpern (HAMA) im menschlichen Organismus, wodurch die Wirkung des therapeutischen Antikörpers vermindert wurde und weitere Nebenwirkungen durch die starke Immunogenizität von murinen Antikörpern im Menschen induziert wurden<sup>73, 74</sup>. Zudem zeigten sie nur geringe therapeutische Erfolge, da Fc $\gamma$ -Rezeptoren und Komplementfaktoren nur schwach an murine IgG-Moleküle binden. Dadurch kommt es zur ineffizienten Rekrutierung von Immun-Effektorzellen<sup>23</sup>. Bis Ende der 1980er Jahre wurden monoklonale Antikörper durch die Immunisierung von Mäusen gewonnen. Der entscheidende Schritt zur Verbesserung der Antikörper-Wirkprofile und zur Verringerung der Immunogenizität war die Generierung und Verwendung von vollständig humanen Antikörpern. Dies wurde z. B. durch die Methode des CDR-*Grafting*, bei welcher die Antigen-bindenden Regionen eines murinen Antikörpers auf ein humanes IgG-*Scaffold* (Gerüst) übertragen werden,<sup>75</sup> und durch die Immunisierung von transgenen Mäusen erreicht,

---

die humane Antikörpersequenzen exprimieren<sup>76, 77</sup>. Ein weiterer Schritt war die Entwicklung von *in vitro*-Technologien zur Humanisierung von Antikörpern mittels Antikörper-Engineering<sup>78</sup>.

Antikörper-Engineering ist ein Oberbegriff für Technologien zur Isolierung und Optimierung von therapeutischen Antikörpern, z.B. zum Zweck der Humanisierung<sup>79</sup>. Zudem können therapeutische Antikörper mit gewünschten Spezifitäten erzeugt werden. Ein interessanter Aspekt in dieser Hinsicht ist die Generierung von Antikörpern, die spezifisch für Antigene sind, die aufgrund ihrer Toxizität nicht zur Immunisierung von Tieren verwendet werden können<sup>80</sup> oder Antigene, die aufgrund von Homologien keine Immunantwort im Wirtsorganismus induzieren.

Man bedient sich hierbei verschiedener Technologien wie dem rationalen Design oder der Methode der gerichteten Evolution. Im Zentrum des rationalen Designs steht die Vorhersage der Antikörperstruktur mithilfe von Sequenzinformationen. Hierfür wird standardmäßig auf große Datenbanken zurückgegriffen, in denen Sequenz- und Strukturinformationen hinterlegt sind<sup>81</sup>. Bei dem Transfer von CDR-Schleifen nicht-humaner Antikörper auf humane Antikörpergerüste macht man sich z.B. zunutze, dass CDR-Schleifen eine begrenzte Anzahl an kanonischen Formationen einnehmen können<sup>82</sup>. Durch die Identifizierung von wichtigen Aminosäureresten, die relevant für die Ausbildung der spezifischen Schleifenstruktur sind, und unter Berücksichtigung dieser und Übertragung der CDR-Schleifen auf humane Antikörpergerüste, wird diese Methode zur Humanisierung von Antikörpern verwendet<sup>83</sup>.

Bei der gerichteten Evolution hingegen erfolgt die Präsentation einer Sammlung von Proteinvarianten auf der Oberfläche z.B. von Phagen, Hefe- oder *E. coli* Zellen. Dieser Aspekt des Antikörper-Engineering wird im Folgenden erläutert.

---

## 1.6 Gerichtete Evolution und Durchmusterung von Molekülbibliotheken

---

Der Prozess der gerichteten Evolution wird als die Optimierung und Identifizierung von Proteinen, Peptiden und Enzymen mittels DNA-Mutagenese verstanden, in welchem der natürliche Evolutionsprozess *in vitro* nachgeahmt wird. Hierzu bedient man sich diverser Mutagenesetechniken, wie der zufälligen und ortsspezifischen Mutagenese oder des DNA-Shuffling, durch die eine Vielzahl an DNA- und letztlich Protein-Varianten erzeugt werden. Aus dieser Sammlung können im Anschluss mittels Hochdurchsatz-Techniken Varianten identifiziert werden, die die gewünschten Eigenschaften zeigen<sup>84-87</sup>.

---

Zusätzlich zu den oben genannten *in vitro*-Technologien zu Diversifizierung von DNA-Sequenzen ist die Verwendung von *in vivo*-Mutagenese-Techniken interessant, denn in diesem Fall findet die Diversifizierung von DNA-Sequenzen intrazellulär durch die Generierung und Verwendung von sogenannten Mutatorstämmen statt<sup>88</sup>.

Die Identifizierung von Varianten mit neuen Eigenschaften wird innerhalb eines Selektionsprozesses realisiert, in welchem das translatierte Protein auf der Oberfläche einer selektierbaren Einheit exponiert wird. Hierbei kann es sich sowohl um *in vivo*-Systeme wie *E. coli*- oder Hefe-Zellen, aber auch um *in vitro*-Systeme wie der Oberflächenpräsentation auf Ribosomen, bekannt als *Ribosome Display*, handeln<sup>89</sup>. Diese Einheit kann anschließend durch Interaktion mit dem gewünschten Antigen (Interaktionspartner) markiert und z.B. mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung isoliert werden. Der Erfolg der Selektion hängt maßgeblich von der Verfügbarkeit und Replizierung der genetischen Information des selektierten Proteins ab. Erst die stabile Kopplung zwischen Geno- und Phänotyp garantiert die Identifizierung und Charakterisierung der Proteinvariante<sup>90</sup>. Durch die Aufeinanderfolge von Mutagenese, Selektion und Amplifikation reichern sich dann Proteinvarianten mit den gewünschten Eigenschaften an. Erfolgreich wurde dieses Prinzip z.B. zur Humanisierung eines murinen TNF $\alpha$ -spezifischen Antikörpers mittels *Phage Display* angewandt und führte 2003 zur Marktzulassung des ersten vollständig humanen Antikörpers Adalimumab<sup>91</sup>. Im nachfolgenden Abschnitt ist als Beispiel für eine Methode zur Genotyp-Phänotyp Kopplung die Oberflächenpräsentation auf Hefezellen erläutert.

---

## 1.7 Oberflächenpräsentation auf Hefezellen

---

Die Exponierung von Protein- und Peptidbibliotheken auf der Oberfläche von Hefezellen wird als Technik zur gerichteten Evolution von Proteinen verwendet und in der Literatur als „*Yeast Surface Display*“ bezeichnet. Etabliert wurde diese Technologie 1997 von Boder und Wittrup<sup>92</sup>. Ihnen gelang es zum ersten Mal, scFv-Fragmente einer kombinatorischen Bibliothek funktionell auf der Oberfläche von Hefezellen zu präsentieren und durchflusszytometrisch zu durchmustern und scFv-Fragmente mit gesteigerter Affinität für das Antigen zu isolieren<sup>92</sup>. Ermöglicht wurde dies durch die stabile Kopplung von Geno- und Phänotyp, da das scFv-Fragment als Fusionsprotein mit einem Hefe-eigenen Zellwandprotein präsentiert wurde.

Die vermutlich wichtigste Errungenschaft, die durch die Verwendung der Hefe-basierten *Display*-Technologie erfolgte, ist die direkte Anwendbarkeit von Fluoreszenz-aktivierter

Zellsortierung (FACS), die bei der effizienten Durchmusterung von großen Varianten-Bibliotheken entscheidend ist. Eine stabile Genotyp-Phänotyp Kopplung wird durch die Fusionierung eines heterologen Proteins mit Proteinen der äußeren Zellwand von *S. cerevisiae* erreicht. Die dadurch erreichte Exponierung des Proteins ist die Voraussetzung für die Interaktion mit Antigenen.

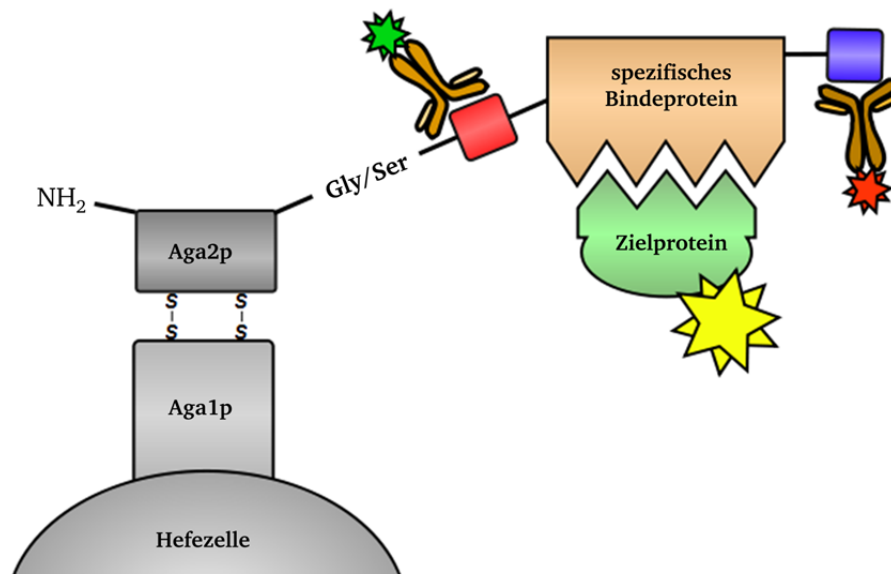
Prinzipiell sind viele verschiedene Zellwandproteine imstande, heterologe Proteine und Peptide als Fusionspartner zu exponieren, z.B.  $\alpha$ -Agglutinin und a-Agglutinin, Cwp1p und Flo1p<sup>93, 94</sup>. Unter all diesen Proteinen hat sich das a-Agglutinin System besonders etabliert. Zur Zeit findet dieses System Anwendung in der Selektion von Antikörpern aus naiven, immunisierten und synthetischen Antikörper-Bibliotheken. Feldhaus und Mitarbeiter zeigten im Jahr 2003 die Selektion hoch-affiner scFv-Varianten aus einer nicht-immunisierten humanen Varianten-Bibliothek, die auf der Oberfläche von *Saccharomyces cerevisiae* präsentiert wurde<sup>95</sup>. Auch die Affinitätsmaturierung von Antikörper-Fragmenten konnte erfolgreich durch die Oberflächenpräsentation von Fab-Fragmenten auf Hefezellen gezeigt werden<sup>96</sup>. Im folgenden Kapitel ist das 1997 von Boder und Wittrup etablierte System zur Oberflächen-präsentation auf Hefezellen mittels a-Agglutinin näher erläutert.

---

## 1.8 Das a-Agglutinin System

---

Agglutinine sind Paarungstyp-spezifische Adhäsionsproteine der äußeren Zellwand von *S. cerevisiae* und vermitteln die Zell-Zell-Anhaftung zwischen haploiden Hefezellen komplementären Paarungstyps während der Verschmelzung dieser Zellen zur diploiden Zygote. Dieser Prozess wird in der Literatur als Mating bezeichnet. Hefezellen mit dem Paarungstyp a exprimieren a-Agglutinin und Hefezellen mit dem Paarungstyp  $\alpha$  exprimieren  $\alpha$ -Agglutinin<sup>97</sup>. Das Zellwandprotein a-Agglutinin baut sich aus den Untereinheiten Aga1p und Aga2p auf. Die Untereinheit Aga1p besitzt ein GPI-Ankersignal und vermittelt die Befestigung des Proteins in der extrazellulären Matrix der Zellwand durch die kovalente Bindung von  $\beta$ -Glucan<sup>98</sup>. Die Untereinheit Aga2p wird ebenfalls von der Zelle sekretiert und ist mit Aga1p über zwei Disulfidbrücken verbunden. Für die Exponierung von heterologen Proteinen unter Verwendung des a-Agglutinin Systems wird das zu präsentierende Protein in der Regel als C-terminale Fusion mit der Untereinheit Aga2p in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert<sup>92</sup>. Das nach der Induktion der Genexpression translatierte und auf der Oberfläche präsentierte rekombinante Konstrukt ist schematisch in Abb. 1.7 dargestellt.



**Abb. 1.7: Oberflächenpräsentation auf Hefezellen nach Boder und Wittrup.**

Schematische Darstellung des von Boder und Wittrup etablierten  $\alpha$ -Agglutinin Systems zur Oberflächenpräsentation rekombinanter Proteine auf Hefezellen unter Verwendung des *pYD1* Plasmids und des Stamms EBY100. Gezeigt ist das auf der Zelloberfläche verankerte Adhäsionsprotein  $\alpha$ -Agglutinin, das sich aus den Untereinheiten Aga1p und Aga2p zusammensetzt. Das rekombinante Konstrukt wird als C-terminale Aga2p-Fusion präsentiert. Zwei Affinitätsepitope (rot und blau) können mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Das spezifische Bindeprotein (braun) wird durch die Interaktion mit dem biotinylierten Zielprotein (grün) und dem Konjugat Streptavidin-R-Phycoerythrin (gelb) markiert. (Modifiziert nach Pepper *et al.*<sup>99</sup>).

AGA1 (Aga1p) wird von einer chromosomal integrierten Galaktose-induzierbaren Expressionskassette exprimiert. Durch die Assoziation von Aga1p und Aga2p wird das heterologe Protein kovalent auf der Oberfläche der Hefezelle exponiert und kann anhand seiner Bindungseigenschaften oder mittels Affinitätsepitopen durchflusszytometrisch detektiert werden (Abb. 1.7). Für die Expression, Sekretion und Oberflächenpräsentation diverser Proteine war während der vorliegenden Arbeit das „*pYD1 Yeast Display Vector Kit*“ (Invitrogen) kommerziell erhältlich.

## 1.9 *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionssystem

Rekombinante Proteine werden schon lange erfolgreich in verschiedenen Wirtsorganismen hergestellt. Hierzu zählen prokaryotische Expressionssysteme wie *E. coli*<sup>100</sup> aber auch eukaryotische Expressionssysteme wie Säugerzellen<sup>101</sup>. *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich ebenfalls zur Expression heterologer Proteine, auch deshalb, weil es der am besten



charakterisierte eukaryotische Wirtsorganismus ist, der besonders seit der Genomsequenzierung 1996 als Modellorganismus zur Untersuchung eukaryotischer Zellfunktionen verwendet wird<sup>102, 103</sup>. Als einzelliger Organismus ist er weniger komplex als andere eukaryotische Systeme und seine Kultivierung ist in definiertem Medium möglich, wodurch eine gute Kontrolle der Wachstumsbedingungen und eine deutliche Reduzierung der Kultivierungskosten möglich ist<sup>104</sup>. Der vergleichsweise kurze Lebenszyklus mit einer Generationszeit von ca. 90 Minuten ist ein weiterer Grund für die bevorzugte Verwendung der Hefe *S. cerevisiae*<sup>102</sup>. Als Einzeller kombiniert die Hefe sowohl die Vorteile mikrobiologischer Expressionssysteme durch die einfache Kultivierung und die Anwendung industrieller Fermentationsmethoden als auch die Vorteile eukaryotischer Expressionssysteme durch das Vorhandensein eukaryotischer Expressions- und Sekretionswege in der Zelle. Darüber hinaus ist eine große Auswahl an Hefevektoren vorhanden, die die genetische Manipulation ermöglicht<sup>105</sup>. Im Vergleich zu anderen Hefen wie z.B. *Pichia pastoris* wird *S. cerevisiae* oft eine geringere Sekretionseffizienz zugeschrieben, weshalb sie industriell oft nicht als Wirtsorganismus für die Produktion heterologer Proteine favorisiert wird<sup>106</sup>. Die Bedeutung der Hefe *S. cerevisiae* als Wirtsorganismus für die Expression heterologer Antikörpermoleküle ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

---

### 1.10 Antikörperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

---

Für eine biochemische und biophysikalische Charakterisierung z.B. mittels Immuno-präzipitation, ELISA oder Biolayer-Interferometrie ist es notwendig, die rekombinanten Proteine in ausreichendem Maße zu produzieren. Derzeit existiert bereits eine Vielzahl von Produktionssystemen, die eine ausreichende Ausbeute eines löslichen Antikörpers oder Antikörper-Fragments erzielen. Bei diesen Expressionssystemen handelt es sich z. B. um Säugerzellen, die Spaltheife *Pichia pastoris*, Insektenzellen oder *E. coli*<sup>107-109</sup>. Die Expression von Antikörpern in *S. cerevisiae* erwies sich lange Zeit als weniger geeignet, da die Ausbeuten oft zu gering für weitere Anwendungen waren. Für IgG-Moleküle wurden lediglich Ausbeuten von 50 µg/L erzielt<sup>110</sup>. Durch einen evolutiven Ansatz gelang es Rakestraw und Mitarbeitern 2009, die Sekretion von scFv-Fragmenten und IgG-Molekülen aus *S. cerevisiae* deutlich zu steigern. Mittels Durchmusterung einer Variantenbibliothek für das Signalpeptid MFa1p wurden Mutanten identifiziert, die die Sekretion von scFv-Fragmenten aus *S. cerevisiae* um das 16fache gegenüber der Wildtypsequenz erhöhten<sup>111</sup>. Mit dem gleichen Ansatz in Kombination mit der Manipulation des Hefestamms konnte die Sekretion eines funktionellen



IgG-Moleküls sogar um das 180fache erhöht werden<sup>111</sup>. Dieser Befund demonstriert die Relevanz des verwendeten Signalpeptids für die Sekretion heterologer Proteine in Hefezellen. Besondere Bedeutung findet dieser Umstand in industriellen Prozessen, in welchen eine ausreichende Sekretion wichtig für die Vereinfachung von nachfolgenden Prozessschritten ist<sup>10</sup>.

Ebenso entscheidend ist auch die Wahl des geeigneten Hefestamms. Durch die genetische Manipulation von Expressionstämmen ist es möglich, die Sekretionsleistung eines Stamms für die Expression heterologer Antikörper-Moleküle zu erhöhen. In diesem Zusammenhang sind Proteine wichtig, die mit dem Sekretionsweg der Hefe assoziiert sind. Dabei handelt es sich z.B. um Enzyme wie die Oxidoreduktase PDI (*Proteine disulfide isomerase*), welche an der Reduktion und Oxidation von Disulfidbrücken beteiligt ist und HSP70 Chaperone wie BiP (*Binding immunoglobulin protein*), die an der Faltung von sekretorischen Proteinen beteiligt sind<sup>112</sup>. Es wird vermutet, dass BiP unreifes Protein im endoplasmatischen Reticulum (ER) bindet und so die Bildung von Aggregaten verhindert. Durch Mutantenanalysen konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von BiP zur Aggregation des unreifen Proteins und zum Verbleib desselben im ER führt<sup>113</sup>. Daraus folgt dann im Allgemeinen die Induktion der UPR (*Unfolded protein response*)<sup>114</sup> und die proteolytische Degradation des Proteins mittels ERAD (*ER associated protein degradation*)<sup>115</sup>, die Blockade der Proteinsynthese und die Aktivierung von Chaperon-kodierenden Genen<sup>116</sup>. Es lässt sich der Schluss ziehen, dass der Mechanismus der Qualitätskontrolle im ER einer der kritischsten Engpässe während der löslichen Sekretion von heterologen Proteinen in Hefezellen ist<sup>117</sup>. Durch die Überexpression von Faltungshelfern wie PDI und BiP konnte gezeigt werden, dass die Sekretion eines scFv-Fragments in *S. cerevisiae* um das Zehnfache gesteigert werden konnte<sup>106, 118</sup>. Allerdings wird in der Literatur darauf hingewiesen, dass das Profitieren eines zu sekretierenden Proteins von der Überexpression von PDI und BiP stark von den Eigenschaften des spezifischen Proteins abhängig ist, und dass es Proteine gibt, die von der Überexpression von PDI und BiP nicht profitieren<sup>106, 119</sup>.

Als Eukaryot eignet sich Hefe gut zur Produktion von heterologen humanen Proteinen, da die Prozessierung und Sekretion den eukaryotischen Mechanismen der Proteinexpression folgt. Diese Mechanismen beinhalten posttranslationale Prozessierungen wie Faltung, Glykosylierung und Phosphorylierung<sup>115</sup>. Die Expression, Faltung im ER und Sekretion des Proteins unterliegen einer strengen Qualitätskontrolle, die bewirkt, dass korrekt gefaltetes und funktionelles Protein aus Hefe-Expressionskulturen isoliert werden kann.

---

## 2 Materialien

---

### 2.1 Bakterienstämme

---

*E. coli* One Shot TOP10 kompetente Zellen, Invitrogen, Deutschland

Genotyp: F– *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

---

### 2.2 Hefestämme

---

EBY100: *MAT $\alpha$  URA3-52 trp1 leu2 $\Delta$ 1 his3 $\Delta$ 200 pep4::HIS3 prb1 $\Delta$ 1.6R can1 GAL* (pIU211:*URA3*). Teil des „Yeast Display Vector Kit“, Invitrogen, Deutschland

BJ5464: *MAT $\alpha$  URA3-52 trp1 leu2 $\Delta$ 1 his3 $\Delta$ 200 pep4::HIS3 prb1 $\Delta$ 1.6R can1 GAL* (ATCC Nr. 208288)

EBY100 *URA*<sup>–</sup>: Generiert durch 5-FOA Selektion. Biochemie, AK Prof. Kolmar, TU Darmstadt, Deutschland

BJ5464-*URA*<sup>–</sup>: Generiert durch 5-FOA Selektion, Merck Serono, Merck KGaA, Deutschland

APO-E: EBY100- *URA*<sup>–</sup> und Integration des Vektors pRS306-PDI

APO-B: BJ5464- *URA*<sup>–</sup> und Integration des Vektors pRS306-PDI

---

### 2.3 Nährmedien für die Kultivierung von Bakterienzellen

---

**LB-Medium:**

1% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) NaCl

Die Komponenten wurden in sterilem Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurde das Medium 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Zur Selektion von Plasmid-vermittelter Antibiotikaresistenz erfolgte der Zusatz geeigneter Mengen des Antibiotikums (Ampicillin 100 mg/L und Kanamycin 30 mg/L). Für Agarplatten wurde das Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5% Agar versetzt.

---

<b>SOC Medium:</b>	2% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM MgSO <sub>4</sub>
	20 mM Glukose

SOC-Medium wurde von Invitrogen (Life Technologies Corp.) bezogen.

---

## 2.4 Nährmedien für die Kultivierung von Hefezellen

---

<b>YPD-Medium:</b>	20 g Dextrose
	20 g Pepton
	10 g Hefeextrakt

Die Komponenten wurden in sterilem Wasser gelöst, mit 10 ml PenStrep Mix versetzt und auf 1 L mit sterilem Wasser aufgefüllt. Nach der Sterilfiltration erfolgte die Lagerung bei 4 °C für maximal zwei Monate. Für Agarplatten wurde das Medium mit 1,5% Agar versetzt und 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

### Glukose-haltiges SD-Medium:

Zur Anzucht von Hefezellen mit episomal-kodierten auxotrophen Markergenen wurden SD-Medien (*Synthetic Dropout*) verwendet. Es wurden kommerziell erhältliche Aminosäure-dropout-Mischungen (DO-Mix) in Pulverform (Clontech Laboratories Inc.) verwendet. Der gewünschte DO-Mix wurde anschließend mit 26,7 g/L Basismix (*Minimal SD-Base*) gemischt, in sterilem Wasser unter Rühren gelöst, auf 990 ml aufgefüllt und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde diesem 10 ml PenStrep Mix zugesetzt. Die Lagerung der Medien erfolgte bei Raumtemperatur für maximal vier Wochen. Für Agarplatten wurde der Basismix (*Minimal SD-Agar Base*) (Clontech Laboratories Inc.) verwendet.

Für die Selektion von Transformanten mit episomal kodierter G418-Resistenz wurden sowohl Flüssigmedien als auch Agarplatten mit 150 mg/L Geneticin versetzt.

Zur Herstellung von Hefe-Bibliotheken wurde das Medium mit 5 g/L Glukose hergestellt und als *Low-SD-Medium* bezeichnet.

**Glukose-haltiges SD-Medium + PEG8000:**

26,7 g Basismix (*Minimal SD-Base*) wurden in 490 ml sterilem Wasser gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Separat wurde der gewünschte DO-Mix mit 5,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8,56 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O in 100 ml sterilem Wasser gelöst und ebenfalls für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. In einem weiteren Ansatz wurden 110 g PEG8000 in 400 ml sterilem Wasser unter Rühren gelöst. Alle Komponenten wurden gemischt, mit 10 ml PenStrep Mix versetzt und sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur für maximal vier Wochen.

**Galaktose-haltiges SD Medium:**

Zur Induktion des Gal1-Promotors wurde an Stelle von 26,7 g/L Basismix (*Minimal SD-Base*) 37 g Galaktose-haltiger Basismix (*Minimal SD-Base Gal/Raf*) (Clontech Laboratories Inc.) verwendet. Der Basismix wurde in 890 ml sterilem Wasser gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Separat wurde der gewünschte DO-Mix mit 5,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8,56 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O in 100 ml sterilem Wasser gelöst und ebenfalls für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen beider Lösungen wurden Basis- und DO-Mix vereinigt und mit 10 ml PenStrep Mix versetzt. Das Medium wurde bei Raumtemperatur maximal vier Wochen gelagert.

**Galaktose-haltiges SD Medien + PEG8000:**

37 g Basismix (*Minimal SD-Base Gal/Raf*) wurden in 490 ml sterilem Wasser gelöst und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Separat wurde der gewünschte DO-Mix mit 5,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8,56 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O in 100 ml sterilem Wasser gelöst und ebenfalls für 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. In einem weiteren Ansatz wurden 110 g PEG8000 in 400 ml sterilem Wasser unter Rühren gelöst und dem autoklavierten Medium zugeführt. Nach vollständiger Vermischung aller Komponenten wurde der Ansatz sterilfiltriert und mit 10 ml PenStrep Mix versetzt. Das Medium wurde bei Raumtemperatur maximal vier Wochen gelagert.

Für die Selektion von Transformanten mit episomal kodierter G418-Resistenz wurde das Galaktose-haltige SD-Medium + PEG8000 mit 150 mg/L Genetecin versetzt.

---

**5-Fluororotsäure Agarplatten:**

**Agarmix:** 23,4 g Basismix (*Minimal SD-Base Agar*)  
0,37 g DO-Mix (-Trp)  
150 mg Tryptophan  
ad 300 ml steriles Wasser

Die Lösung wurde im Anschluss 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert.

**5-FOA-Mix:** 15 mg Uracil  
0,5 g 5-Fluororotsäure  
ad 200 ml steriles Wasser

Die Lösung wurde im Anschluss sterilfiltriert und mit dem Agarmix vereinigt. Nach erneutem Aufkochen wurden Petrischalen befüllt.

## 2.5 Plasmide

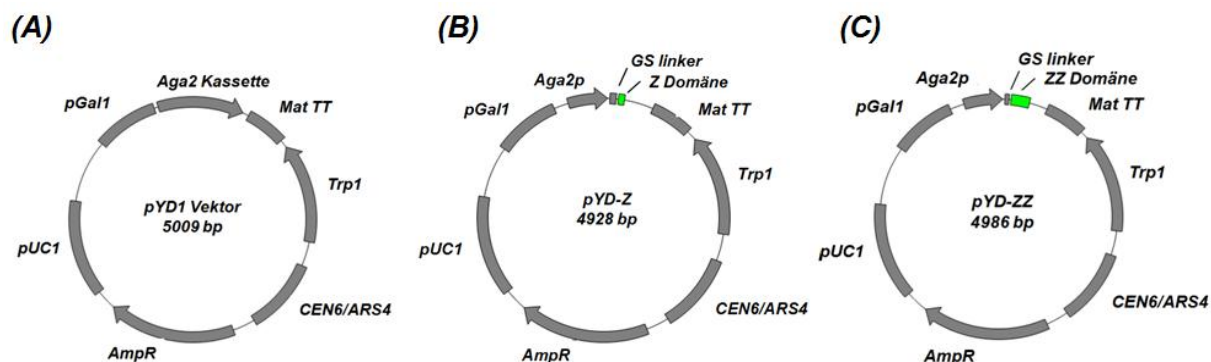


Abb. 2.8: Plasmide zur Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne.

(A) Schematische Darstellung des Plasmids *pYD1* zur Oberflächenpräsentation von Aga2p-Fusionsproteinen auf der Oberfläche von EBY100 Zellen (Invitrogen) und der Plasmide für die Oberflächenpräsentation der Z-Domäne *pYD-Z* (B) und der ZZ-Domäne *pYD-ZZ* (C) als Aga2p-Fusion. *pYD-ZZ* existierte zusätzlich noch mit einer G418-Resistenzkassette anstelle des Auxotrophiemarkers *Trp1* und wird als *pYD-ZZ-G418* bezeichnet (Plasmidkarte nicht gezeigt).

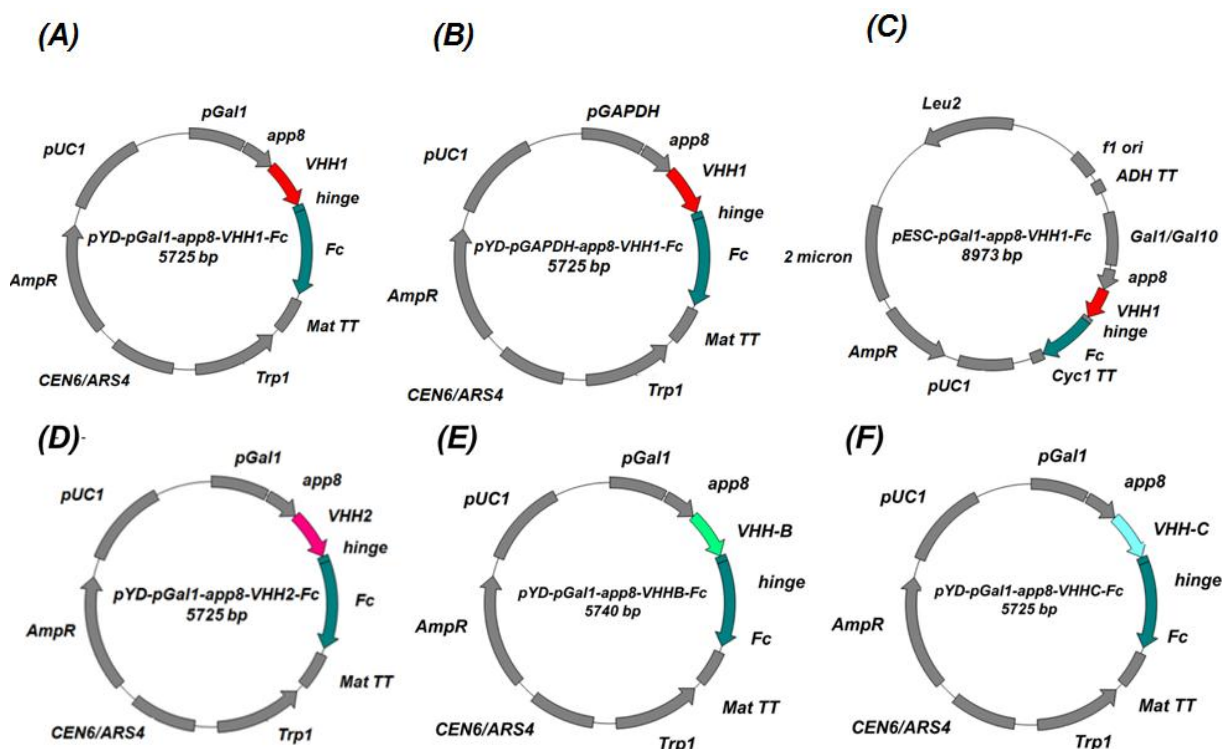


Abb. 2.9: Plasmide zur löslichen Sekretion.

Schematische Darstellung der Plasmide zur löslichen Sekretion. Alle Plasmide kodieren für das Signalpeptid *app8* für die lösliche Sekretion. (A-C) Sekretionsplasmide für die hEGFR-spezifische VHH-Domäne; exprimiert als Fc-Fusionsprotein. (D) Sekretionsplasmid für die Trx-spezifische VHH-Domäne, exprimiert als Fc-Fusionsprotein. (E) Sekretionsplasmid für die VHH-Domäne B. (F) Sekretionsplasmid für die VHH-Domäne C.

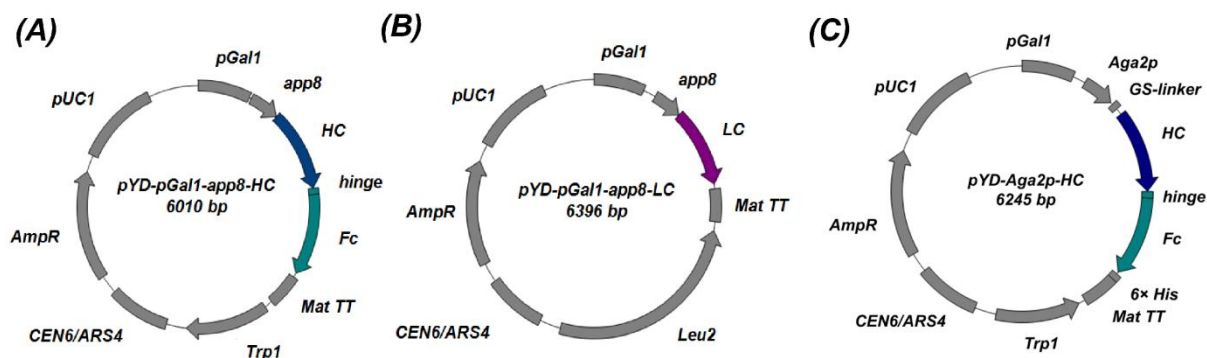


Abb. 2.10: Plasmide zur löslichen Sekretion von IgG-Molekülen.

Plasmide zur löslichen Sekretion von (A) schwerer und (B) leichter Kette des IgG-Moleküls Matuzumab vermittelt durch das Signalpeptid app8. (C) Plasmid zur Expression der schweren Kette von Matuzumab als Aga2p-Fusion.

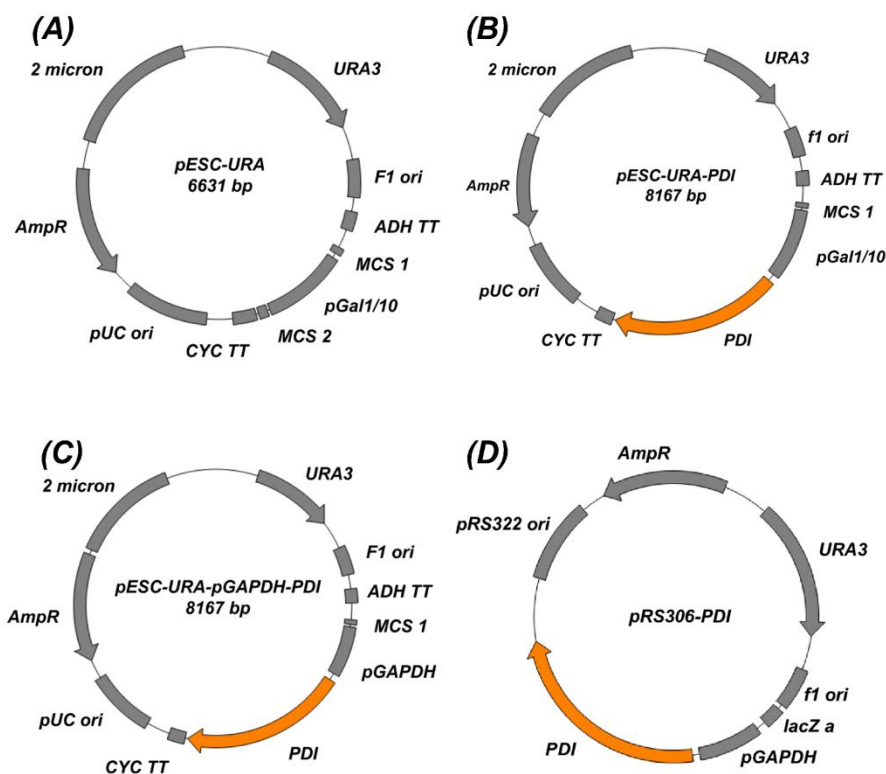


Abb. 2.11: Plasmide zur chromosomalen PDI-Integration.

(A) pESC-URA Vektor von Agilent Technologies Inc.. (B) pESC-URA Vektor mit PDI-Sequenz. (C) pESC-URA Vektor mit PDI-Sequenz und GAPDH-Promotor (PDI-Expressionskassette). (D) pRS306-Integrationsvektor zur chromosomalen Integration der PDI-Expressionskassette und Überexpression der Oxidoreduktase PDI.

#### Diverse Plasmide:

pFA6a-kanMX4 (Biochemie, TU Darmstadt, AK Prof. Kolmar), pGAPZA (Invitrogen), pRS306 (ATCC)

## 2.6 Oligodesoxyribonukleotide

Alle verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen und HPSF gereinigt. Oligodesoxyribonukleotide, für die homologe Rekombination in Hefezellen wurden zusätzlich HPLC gereinigt. Die Sequenzen sind in der Orientierung 5' → 3' dargestellt.

### Oligodesoxyribonukleotide zur Analytik:

<i>pYD mcs up</i>	GGCAGCCCCATAAACAC
<i>pYD mcs rp</i>	GTATATTGTATTTTGTACGAGC
<i>pYD pex up</i>	CAGGAAACAGCTATGACC
<i>pYD pex rp</i>	GCATCTTAATTGAAAATGTATGAAG
<i>pESC mcs up</i>	GATTGGAGACTTGACCAAAC
<i>pESC mcs rp</i>	GATATGTATATGGATATGTATATGG
<i>kanR seq up</i>	GGTCATGAGATTATCAAAAAGGATC
<i>kanR seq rp</i>	GCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTC
<i>seq Trp/Leu up</i>	GATGAATGTGAATCGAATCC
<i>seq Trp/Leu rp</i>	ATCACGAGGCCCTTTC
<i>Fc up</i>	GCCACCCAGACCTACATCT
<i>Fc rp</i>	CCATATGTCCTTCCGAGTG
<i>M13 fw</i>	GTAAAACGACGGCCAG
<i>M13 rev</i>	CAGGAAACAGCTATGAC

### Oligodesoxyribonukleotide für Mutagenesen:

<i>N-Q-HC-mut</i>	GCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGC
<i>pGal KpnI up</i>	GAGGAAAAATTGGCAGTAGGTACCTGGCCCCACAAACCTTC
<i>pGal KpnI rp</i>	GAAGGTTTGTGGGGCCAGGTACCTACTGCCAATTTTTCCTC
<i>ep-VHH1-up</i>	GAAGGGGTACAACCTCGATAAAAGA
<i>ep-VHH1-rp</i>	GTCTTGTCACCTTGATTTTGGGTTAAC



### Oligodesoxyribonukleotide zur Generierung von PCR-Produkten für die Plasmid-Konstruktion mittels homologer Rekombination:

<i>pYD Trp/Leu rp</i>	GTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTA AATTCGATGACTGGAAAT
<i>pYD Trp/Leu up</i>	GTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAAC GAATCGTAGTTTCATGATT
<i>kanR Leu up</i>	GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTG ACAGTTATCTTTCTACGGGGTCTG
<i>kanR Leu rp</i>	GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAA GGAAGAGTTTAGAAAAACTCATCGAGCATC
<i>gapdh-pYD-up</i>	CTCGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGCTAGT AGATCTTTTTTTGTAGAAATGTC
<i>gapdh-pYD-rp</i>	GCTGCGAATAAAACTGCAGTAAAAATTGAAGGAAATCTCAT GGTATAGTTGTTCAATTGATTGAAATAG
<i>gapdh-VHH-up</i>	CTCGGAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGCTAG TAGATCTTTTTTTGTAGAAATGTC
<i>gapdh-VHH-rp</i>	GCTGCGAATAAAACTGCAGTAAAAATTGAAGGAAATCTCAT GGTATAGTTGTTCAATTGATTGAAATAG
<i>pYD VHH2 up</i>	AATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGT ACAACTCGATAAAAGAATGGCGGACTACAAAGAC
<i>pYD VHH2 rp</i>	AAGTTCGGGTGCAGGACATGGGGGACACGTGTGGGTCTTGT CACTTGATTTTGGGTTAACCGAGCTCACGGTCAC
<i>pYD VHHB up</i>	GCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTACAACTCGATAA AAGACAGGTCCAGCTCCAG
<i>pYD VHHB rp</i>	TGTTACATCTACACTGTTGTTATCAGATCAGCGGGTTTAAAC TCATCATTTACCCGGGGAC
<i>pYD VHHC up</i>	CTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTACAACTC GATAAAAGAGAGGTCCAGCTGGTG
<i>pYD VHHC rp</i>	TGTTACATCTACACTGTTGTTATCAGATCAGCGGGTTTAAACTC ATCATTTACCCGGGGAC

---

<i>GR-ep-VHH1-up</i>	CTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTACAACCTC GATAAAAGACAGGTGAAACTGGAAGAGTC
<i>GR-ep-VHH1-rp</i>	GCAGGACATGGGGGACACGTGTGGGTCTTGTCACCTTGATTTT GGGTTAACGCTAGAGACGGTCACCTG
<i>NNK-GR-up</i>	GAAGAGTCTGGCGGGGGCTCCGTGCAGACAGGGG GAAGCCTCAGGCTCAC
<i>NNK-GR-rp</i>	GTATTCTTTGCGTTATCCCGTGAGATGGTAAAGCGTCCTTT AACGGAATCG
<i>PDI-GR-up</i>	GGATCCGTAATACGACTCACTATAGGGCCCGGGCGTCGACATGAGTTTT CTGCTGGTGC
<i>PDI-GR-rp</i>	GTTAGAGCGGATCTTAGCTAGCCGCGGTACCAAGCTTACTCTTACAATT CATCGTGAATGGC
<i>GR-kanMX4-up</i>	GTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACGACATGGAGG CCCAG
<i>GR-kanMX4-rp</i>	GTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTCAGTATAGCG ACCAGCAT

---

## 2.7 Proteine

---

### 2.7.1 Enzyme

---

Folgende Restriktionsenzyme wurden von der New England Biolabs GmbH bezogen:

*Bam*HI, *Bgl*II, *Bst*BI, *Btg*I, *Btg*ZI, *Cla*I, *Dpn*I, *Eco*RI, *Hpa*I, *Kas*I, *Kpn*I, *Nco*I, *Nhe*I, *Not*I, *Sac*II, *Pst*I, *Xho*I, EndoH

HotStar HiFidelity Polymerase	Qiagen GmbH, Deutschland
PfuUltra™ High-Fidelity DNA Polymerase	Agilent Technologies Inc., USA
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes Oy, Finnland
T4 DNA-Ligase	Life Technologies Corp., Deutschland
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Deutschland

---

### 2.7.2 Antikörper und Zielproteine

---

Folgende Antikörper wurden von Jackson ImmunoResearch Europe Ltd. bezogen:

- Hase anti-Human IgG Pan, monoklonal
- Hase anti-Ziege IgG, monoklonal, FITC-konjugiert,
- Hase anti-Ziege IgG, Fc-Fragment spezifisch, F(ab')<sub>2</sub> Fragment, FITC konjugiert
- Maus anti-Human IgG, Fc<sub>γ</sub> Fragment spezifisch, R-Phycoerythrin-konjugiert
- Maus anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment spezifisch
- Maus anti-Human IgG, Fc<sub>γ</sub> Fragment spezifisch, POD-konjugiert
- Ziege anti-Hase IgG, POD-konjugiert
- Ziege anti-Human IgG, F(ab')<sub>2</sub> Fragment spezifisch
- Ziege anti-Human IgG, Fc<sub>γ</sub> Fragment spezifisch, POD-konjugiert
- Ziege anti-Human IgG, Fc<sub>γ</sub> Fragment spezifisch, F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Dylight™ 649 konjugiert
- Ziege anti-Human IgG, Fc<sub>γ</sub> Fragment spezifisch, F(ab')<sub>2</sub> Fragment, AlexaFluor™ 647 konjugiert

---

Maus anti-PDI IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc. Deutschland
Ziege anti-Protein A IgG, FITC-Konjugat	Abcam PLC, Großbritannien

**Folgende Proteine wurden von der Merck Serono GmbH (Merck KGaA) bezogen:**

- Cetuximab (Erbix), chimär, IgG1, 152 kD
- hs-cMet-SEMA-His (*homo sapiens*), 57,6 kD
- hsEGFR-(ECD)-His, (*homo sapiens*) 71,4 kD;
- mmEGFR-(ECD)-His; (*mus musculus*) 71,1 kD.
- rFcRn-ECD (*rattus norvegicus*) 41,2 kD

Für die Analysen mittels Durchflusszytometrie und zur Fluoreszenzmikroskopie wurden die Proteine hsEGFR, mmEGFR und rFcRn unter Verwendung des *EZ-Link® Micro Sulfo-NHS-Biotinylation Kit* (Thermo Scientific GmbH) nach Herstellerangaben biotinyliert (Kapitel 3.2.4).

---

### 2.7.3 Sonstiges

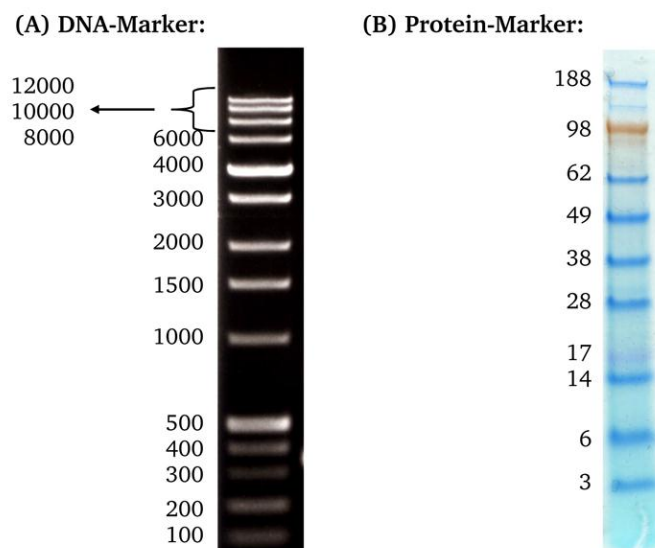
---

<i>AlignFlow™ alignment beads</i> (630-660 nm)	Life Technologies Corp., Deutschland
Flow-Check™ <i>Fluorospheres</i>	Beckman Coulter GmbH, Deutschland
Streptavidin, R-Phycoerythrin-Konjugat (SA-PE)	Life Technologies Corp., Deutschland
Streptavidin <i>Microbeads</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland

## 2.8 Größenstandards

Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten während der Gelelektrophorese wurde der *Novagen Perfect DNA™ Marker* (Merck Millipore, Merck KGaA) verwendet, welcher eine Mischung aus 14 doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmenten mit Größen von 0,1 bis 12 kB (100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000 bp) enthält. Es wurden 10 µl des DNA-Markers in einer Gelelektrophorese eingesetzt.

Um das Molekulargewicht von Proteinen zu bestimmen, wurde in der Gelelektrophorese der Größenstandard *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* (Invitrogen, Life Technologies Corp.) eingesetzt. Er enthält ein Proteingemisch, welches sich im NuPage™ Gel in Molekulargewichte von 3 bis 188 kDa auftrennt (3, 6, 14, 17, 28, 38, 49, 62, 98, 188). Es wurden 10 µl des Protein-Markers in einer Gelelektrophorese verwendet.



**Abb. 2. 1: DNA-Marker und Protein-Marker.**

In (A) ist der verwendete DNA-Marker *Novagen Perfect DNA™ Marker* dargestellt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1%-igen TAE-Agarosegel. Die Größenangaben sind in bp neben den DNA-Fragmenten aufgelistet. In (B) ist der verwendete Protein-Marker *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard* dargestellt. Die Auftrennung erfolgte in einem NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Fertiggel mit MES-Laufpuffer (alles Invitrogen, Life Technologies Corp.). Die Größenangaben sind in kDa neben den Protein-Fragmenten aufgelistet.

---

## 2.9 Chemikalien

---

Folgende Auflistung zeigt die Hersteller der verwendeten Chemikalien.

### **Merck KGaA:**

2-Propanol, Agarose, Ammoniumsulfat, Calciumchlorid, Coomassie<sup>®</sup> Brilliant Blau R250, Dithiothreitol, , Di-Natriumhydrogenphosphat, EDTA, Ethanol, Ethidiumbromid, Essigsäure, Glukose, Glycerol, Guava<sup>®</sup> ICF, HEPES, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Magnesiumacetat Tetrahydrat, Methanol, Natriumchlorid, Natriumdihydrogen-phosphat Monohydrat, Pepton, Sorbitol, Trichloressigsäure, Tween<sup>®</sup> 20, Zitronensäure

### **Applichem GmbH:**

5-Fluororotsäure, TAE-Puffer (50-fach)

### **New England Biolabs GmbH:**

6× DNA Gel Ladepuffer, NEB Puffer 1 bis 4

### **Becton Dickinson GmbH:**

Bacto Casamino Acids, Difco<sup>™</sup> Yeast Nitrogen Base,

### **Clontech Laboratories Inc.:**

DO-Zusätze, Minimal SD-Base, Minimal SD-Base (Gal/Raf), Minimal SD Agar Base

### **Invitrogen, Life Technologies Corp.:**

Western-Blot Diluent A, Western-Blot Diluent B, Western-Blot Waschlösung, Desoxyribonukleotid Triphosphate (dNTPs), Penstrep Mix, NuPAGE<sup>®</sup> MES Laufpuffer, Geneticin<sup>®</sup>

### **Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH:**

Lithiumacetat Dihydrat, Polyethylenglykol (1500, 8000 kD)

### **Expedeon Ltd.:**

InstantBlue<sup>™</sup> (Färbelösung für Proteingele)

## 2.10 Puffer und Lösungen

### Standardpuffer:

1 × PBS:	140 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O
	2 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 × PBST:	0,05%	Tween 20 <sup>®</sup> in 1 × PBS

### Puffer für die Protein A-Affinitätschromatographie am ÄKTA<sup>™</sup> *prime* (FPLC):

Auftragspuffer (pH 7,4):	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O
	10 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O
	3,5 M	NaCl
Elutionspuffer (pH 2,7):	100 mM	Zitronensäure

### Puffer für die Transformation von Hefezellen:

Nach Suga und Hatakayama<sup>120</sup>:

<i>freezing</i> -Puffer:	0,6 M	Sorbitol
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	HEPES
Elektroporationspuffer:	1 M	Sorbitol

### Nach Benatuil et al<sup>121</sup>:

Puffer A:	1 M	Sorbitol
	1 mM	CaCl <sub>2</sub>
Puffer B:	0,1 M	LiAc
	10 mM	DTT

<i>Freezing-solution</i> :	2% Glycerol
	0,67% Yeast Nitrogen Base

**Agarose-Gelelektrophorese:**

<b>1 × TAE:</b>	40 mM	Tris
	1%	Essigsäure
	1 mM	EDTA

**Ethidiumbromid-Lösung:** 1% in sterilem Wasser

**LDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:**

Für die Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die vom Hersteller Life Technologies Corp., Deutschland, vorgeschlagenen Puffer verwendet (s. Kapitel 3.2.9).

**Färben von Polyacrylamid-Gelen:**

<b>Coomassie Färbelösung:</b>	2,5 g/l	Coomassie Brilliant Blue
	40% (v/v)	Ethanol
	10% (v/v)	Essigsäure
<b>Coomassie Entfärbelösung:</b>	10% (v/v)	Essigsäure
	20% (v/v)	Ethanol
<b>InstantBlue™ (Herstellerangaben):</b>	<5%	Lösungsmittel
	<0,05%	Coomassie Brilliant Blue
	<12%	Phosphorsäure
	<2%	Ethanol

**Puffer für die Western-Blot Analyse:**

<b>Western-Blot Waschlösung:</b>	10 ml Waschlösung in 150 ml sterilem Wasser
<b>Western-Blot Blockierlösung:</b>	2 ml Western-Blot Diluent A
	3 ml Western-Blot Diluent B
	5 ml steriles Wasser
<b>Western-Blot Antikörperlösung:</b>	2 ml Western-Blot Diluent A
	1 ml Western-Blot Diluent B
	7 ml steriles Wasser

Die Diluenten A und B sowie die Waschlösung wurden von Life Technologies Corp. bezogen.



---

## 2.11 Kommerziell erhältliche Systeme

---

BigDye <sup>®</sup> Direct cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems <sup>®</sup> , Life Technologies Corp., Deutschland
EZ-Link <sup>®</sup> Micro Sulfo-NHS-Biotinylation Kit	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
GeneMorph II Random Mutagenesis Kit	Life Technologies Corp., Deutschland
Pierce <sup>®</sup> Biotin Quantitation Kit	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
Pierce Yeast DNA Extraction Kit	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
PureLink Quick Plasmid Mini- & Midiprep Kit	Life Technologies Corp., Deutschland
QuikChange <sup>®</sup> site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies Corp., Deutschland
RPM <sup>®</sup> Yeast Plasmid Isolation Kit	MP Biomedicals GmbH, Deutschland
TMB Substrat Kit für Peroxidas	Vector Laboratories Ltd., USA
TOPO <sup>®</sup> TA Cloning Kit for Sequencing	Life Technologies Corp., Deutschland
Wizard <sup>®</sup> SV Gel & PCR Clean-up System	Promega GmbH, Deutschland
Yeast DNA Extraction Kit	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
ZeroBlunt TOPO <sup>®</sup> PCR Cloning Kit	Life Technologies Corp., Deutschland

---

## 2.12 Verbrauchsmaterialien

---

96er Zellkulturplatten mit Rundboden	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
1,5 ml, 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Deutschland
15 ml, 50 ml Falconröhrchen	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Amicon <sup>®</sup> Centricon <sup>®</sup> Konzentratoren	Merck Millipore, Merck KGaA, Deutschland
Botteltop Filter 500 ml	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
Cetricon-Konzentratoren (10 kD)	Merck Millipore, Merck KaGA, Deutschland
Elektroporationsküvette (0,2 cm)	Biorad Laboratories Inc., Deutschland
Erlenmeyerkolben	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
HiTrap <sup>™</sup> Protein A Säule 1ml	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland

---

iBlot <sup>®</sup> Transfer Stack, PVDF	Life Technologies Corp., Deutschland
LS Säulen (MACS-Säulen)	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
NuPAGE <sup>®</sup> 4-12 % Bis-Tris Gele	Life Technologies Corp., Deutschland
Snakeskin <sup>®</sup> Dialyseschlauch 10 kDa	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
Steriflip <sup>®</sup> Sterilfilter 50 ml	Merck Millipore, Merck KGaA, Deutschland
6-well Platten, Nuclon Surface	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
Protein A-Biosensoren	FortéBio, Pall Corp., USA
Maxisorp Mikrotiterplatten	Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland
Mikrotiterplatten (Polypropylen, schwarz)	Greiner Bio-one GmbH, Deutschland
pH-Indikatorstäbchen	Merck KGaA, Deutschland
Plastibrand <sup>®</sup> UV-Küvetten	Brand GmbH & Co. KG, Deutschland
Slide-A-Lyser <sup>®</sup> Mini Dialyse Einheiten	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
Zebra <sup>™</sup> Spin Desalting Columns, 2 ml	Thermo Scientific GmbH, Deutschland

Nicht genannte Verbrauchsmaterialien entsprachen der allgemeinen Laborausstattung.

---

## 2.13 Geräte

---

Analysenwaage	Sartorius AG, Deutschland
Äkta <sup>™</sup> prime, Gerät für die FPLC	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer	Life Technologies Corp., Deutschland
FortéBio Octet RED	FortéBio Pall Corp., USA
GBox Geldokumentation	Syngene Synoptics Ltd., Großbritannien
Genepulser Xcell, CE- und PC-Modul	Biorad Laboratories Inc., Deutschland
Guava easyCyte HT 2L	Merck Millipore, Merck KGaA, Deutschland
IBlot <sup>®</sup>	Life Technologies Corp., Deutschland
Inkubationsschrank Kelvitron <sup>®</sup> t	Heraeus Holding, Deutschland
Magentrührer RH basic	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG, Deutschland

MACS Multistand	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
MACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Mikrowelle	AEG AG, Deutschland
Mikroskop, Axiostar plus	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mikroskopkamera, Axiocam	Carl Zeiss AG, Deutschland
MoFlo Zytometer mit Cyclone <sup>®</sup> Sortiereinheit	Beckman Coulter GmbH, Deutschland
Multifuge X3R	Heraeus Holding GmbH, Deutschland
NanoDrop ND-1000, Spektrophotometer	Thermo Scientific GmbH, Deutschland
pH Meter, 744	Metrohm GmbH & Co. KG, Deutschland
Pipetboy	IBS Integra Bioscience GmbH, Deutschland
Schüttelinkubator, Multitron HT	Infors AG, Deutschland
Sequenziergerät, ABI Prism <sup>®</sup> 3100	Life Technologies Corp., Deutschland
Spannungsgeber Power-Pak 300	Biorad Laboratories Inc., Deutschland
Tetrad 2 PCR Gerät	Biorad Laboratories Inc., Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Deutschland
Ultropsec 3000 Spectrophotometer	GE Healthcare Europe GmbH, Deutschland
Vortexer Reax-top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Deutschland
Wasserbad E200	Lauda DR. R. Wobser GmbH & Co. KG, Deutschland
Wipptisch ST5	VWR International GmbH, Deutschland
XCell Surelock <sup>™</sup> Mini-Cell	Life Technologies Corp., Deutschland
Zentrifuge, Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Deutschland

Nicht genannte Geräte entsprachen der allgemeinen Laborausstattung.

---

## 2.14 Computerprogramme

---

AxioVision v4.8.2	Carl Zeiss AG, Deutschland
BioEdit <i>biological sequence alignment editor</i>	Ibis Bioscience Inc., USA
Gen5 <i>data analysis software</i>	BioTek Instruments Inc., USA
GuavaSoft v1.2	Merck Millipore, Merck KGaA, Deutschland
Octet Data Acquisition v6.4 <i>software</i>	FortéBio, Pall Corp., USA
Octet Data Analysis v6.4 <i>software</i>	FortéBio, Pall Corp., USA
Lasergene <sup>®</sup> v8	DNASTAR Inc., USA
Prime View <sup>™</sup> v5.0	GE Healthcare Europe, Deutschland
Reference Manager v12	Adept Scientific GmbH, Deutschland
Summit v4.3	Beckman Coulter GmbH, Deutschland

---

## 3 Methoden

---

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

---

#### 3.1.1 Anzucht und Vermehrung von Bakterienzellen

---

Die Anzucht und Vermehrung von *E. coli* Zellen erfolgte in LB-Medium, was im Falle von episomal kodierten Antibiotikaresistenzen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Die Kultivierung eines Einzelklons in Selektivmedium erfolgte für ca. 24 Stunden bei 37 °C und 250 Upm im Schüttelinkubator. Kleinere Kulturvolumina von bis zu 3 ml wurden in Reagenzgläsern, größere Kulturen in entsprechenden Schüttelkolben mit Schikane inkubiert.

---

#### 3.1.2 Chemische Transformation von Bakterien

---

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden kommerziell erhältliche chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen, Life Technologies Corp.) transformiert. 50 µl Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 - 150 ng intakter Plasmid-DNA versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4 °C mit anschließendem Hitzeschock bei 42 °C im temperierten Wasserbad für 45 Sekunden und einer nachfolgenden erneuten ein-minütigen Inkubation bei 4 °C. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium und einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C unter leichtem Schütteln im Heizblock wurden die Zellen auf getrockneten LB-Selektivagarplatten ausgestrichen. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden geeignete Verdünnungen hergestellt und ausplattiert. Die Platten wurden im Anschluss bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert.

---

#### 3.1.3 Plasmidisolierung aus Bakterien

---

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen erfolgte mit dem *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep/Midiprep Kit* nach Angaben des Herstellers (Invitrogen, Life Technologies Corp.). Anwendungsspezifisch wurden die Zellen einer stationär wachsenden 2 ml oder einer 50 ml *E. coli* Kultur verwendet.

---

### 3.1.4 Anzucht von Hefezellen

---

Die Anzucht und Vermehrung von Hefezellen erfolgte in YPD-Medium, welchem zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen, eine Mischung aus Penicillin und Streptomycin (PenStrep Mix) zugesetzt wurde. Die Vermehrung und Anzucht von Hefezellen mit episomalen Markergenen erfolgte in geeigneten synthetischen Minimalmedien. Das episomal kodierte Markergen bestimmte die Wahl des Minimalmediums (Kapitel 2.4). Dem Minimalmedium war ebenfalls eine Mischung PenStrep zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei Voll- und Minimalmedium im Schüttelinkubator bei 30 °C und 250 Upm für 48 bis 72 Stunden. Kleinere Kulturvolumina von bis zu 5 ml wurden in Reagenzgläsern, größere Kulturen in geeigneten Schüttelkolben mit Schikane inkubiert.

---

### 3.1.5 Mutagenese mittels 5-Fluororotsäure

---

Zur Mutation des chromosomalen URA3-Markergens der *S. cerevisiae* Stämme EBY100, BJ5464 APO-E und APO-B wurde eine Selektion der Stämme mit 5-Fluororotsäure durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden  $5 \times 10^7$  Zellen beider Stämme auf 5-FOA-Agar (Kapitel 2.4) ausgestrichen und fünf Tage bei 30 °C inkubiert. Im Anschluss wurden sechs Klone unter sterilen Bedingungen auf eine neue 5-FOA-Agarplatte übertragen. Nach weiteren vier Tagen wurden acht Klone unter sterilen Bedingungen auf eine YPD-Agarplatte und auf eine SD-URA (Minimalmedium, welchem Uracil fehlt) Agarplatte übertragen. Die Klone, die kein Wachstum auf der SD-URA Agarplatte zeigten, wurden von der YPD Agarplatte in Flüssigmedium zur Anzucht überführt und Gefrierkulturen angelegt. Bei diesen Klonen wurde von einer erfolgreichen Mutierung des URA3-Markergens ausgegangen.

---

### 3.1.6 Lagerung von Hefezellen

---

Zur langfristigen Lagerung von Hefezellen wurden von den gewünschten Zellen Gefrierkulturen angelegt. Hierzu wurde der Hefeklon auf einer Selektivagarplatte ausgestrichen und 48 bis 72 Stunden bei 30 °C kultiviert. Unter sterilen Bedingungen wurde anschließend eine möglichst große Zellmenge von der Platte abgenommen und in einem Gefriergefäß, welches 1 ml *Freezing-solution* enthielt, resuspendiert. Anschließend wurde das Gefriergefäß bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert.

---

### 3.1.7 Bestimmung der Zelldichte von Hefekulturen

---

Die Zelldichte von Hefekulturen diverser Stämme wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm im UV/Vis-Spektrophotometer bestimmt. Die Proben wurden so verdünnt, dass eine Absorption  $<1$  zu messen war. Mittels Verdünnungsfaktor und nach Abzug des gemessenen Leerwerts (unbeimpftes Medium) wurde im Anschluss die tatsächliche Absorption berechnet. Es wurde davon ausgegangen, dass eine optische Dichte bei 600 nm von 1 einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen entsprach<sup>92</sup>.

---

### 3.1.8 Transformation von Hefezellen

---

Zur Transformation von Hefezellen wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet, die anwendungsspezifisch gewählt wurden.

---

#### 3.1.8.1 Herstellung und Transformation kryokonservierter Hefezellen

---

Die Herstellung von elektrokompetenten *S. cerevisiae* Zellen verschiedener Stämme wurde nach der Suga und Hatakeyama<sup>120</sup> etablierten Methode durchgeführt.

Hierfür wurden aus einer stationär wachsenden *S. cerevisiae* Kultur 100 ml YPD-Medium oder geeignetes (SD-Medium) mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft und in einem 500 ml Schüttelkolben bei 30 °C und 250 Upm bis zu einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen nach 15-minütiger Inkubation auf Eis pelletiert (1600 g, 5 min) und dreimal mit 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in eiskaltem *freezing*-Puffer (Sorbitol,  $\text{CaCl}_2$ , HEPES, pH 7,5) zu einer finalen Zellkonzentration von  $5 \times 10^8$  Zellen/ml resuspendiert. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte durch Aliquotierung der Zellsuspension à 100  $\mu\text{l}$  in ein Gefriergefäß und Kryokonservierung bei -80 °C im Gefrierschrank.

Zur Transformation wurden 100  $\mu\text{l}$  kryokonservierte Hefezellen bei 30 °C im Wasserbad aufgetaut, einmal mit 500  $\mu\text{l}$  Sorbitol (1 M) gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  Sorbitol (1 M) resuspendiert. Zur Transformation wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA und zur Klonierung mittels homologer Rekombination mit 1  $\mu\text{g}$  linearisierter Plasmid-DNA und 3  $\mu\text{g}$  PCR-Produkt gemischt (Kapitel 3.1.12). Der Transformationsansatz wurde anschließend in eine gekühlte Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) überführt und fünf Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Elektroporation wurde im *Genepulser* (Biorad Laboratories Inc.) mit

---

folgenden Einstellungen durchgeführt: 1500 V, 25  $\mu$ F. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 500  $\mu$ l Sorbitol (1 M) resuspendiert und auf Selektivagar ausplattiert und zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert, bis Kolonien angewachsen waren.

---

### 3.1.8.2 Transformation von Hefezellen zur Bibliotheksgenerierung

---

Zur Generierung der VHH-Fc Bibliotheken wurde das von Benatuil und Mitarbeitern<sup>121</sup> etablierte Protokoll angewendet.

Hierfür wurden aus einer stationär wachsenden *S. cerevisiae* Kultur 100 ml YPD-Medium mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml inokuliert. Daran schloß sich eine Inkubation im Schüttelkolben bei 30 °C und 250 Upm an. Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis eine Zelldichte von  $1,6 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht war. Die Zellen wurden im Anschluß pelletiert (1600 g, 5 min) und zweimal mit 50 ml eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift mit eiskaltem Puffer A (1 M Sorbitol/1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) an, bevor die Zellen in 20 ml Puffer B (0,1M LiAc/10 mM DTT) resuspendiert und für weitere 30 Minuten bei den üblichen Bedingungen (250 Upm, 30 °C) kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1600 g, 5 min) und erneut mit 50 ml eiskaltem Puffer A gewaschen. Durch das Resuspendieren des Zellpellets mit  $\sim 130 \mu$ l Puffer A wurde ein Endvolumen von ca. 1 ml erreicht. Pro Elektroporationsansatz wurden 400  $\mu$ l der Zellsuspension mit 4  $\mu$ g linearisiertem Vektor und 6  $\mu$ g PCR-Produkt vermischt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und in eine Elektroporationsküvette (2 mm Spaltbreite) überführt.

Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V und 25  $\mu$ F. Im Anschluss wurden die Zellen in 8 ml YPD/Sorbitol-Lösung (1:1 gemischt) überführt und für eine Stunde in einem Reagenzglas bei den üblichen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1600 g, 5 min) und in 250 ml geeignetes SD-Medium überführt und für 24 Stunden bei 30 °C und 250 Upm kultiviert. Zur Bestimmung der Anzahl an unabhängigen Klonen innerhalb der Bibliothek und zur Abschätzung der Transformationseffizienz wurden geeignete Verdünnungen hergestellt, auf Selektivagarplatten ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Die Bibliotheksgröße wurde durch das Auszählen der angewachsenen Kolonien und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors bestimmt.



---

### 3.1.9 Lagerung von Hefe-Bibliotheken

---

Zur langfristigen Lagerung der VHH-Fc Bibliothek wurde eine Zellzahl, die der zehnfachen Bibliotheksgröße entsprach, in geeignetes *Low-SD-Medium* (5 g Glukose/L) überführt und drei Tage bei 30 °C und 250 Upm inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden  $1 \times 10^{10}$  Zellen dieser Kultur pelletiert (1600 g, 5 min), in *Freezing-solution* resuspendiert, in ein geeignetes Gefriergefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

---

### 3.1.10 Plasmidisolierung aus Hefezellen

---

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefezellen erfolgte mit Hilfe des *RPM<sup>®</sup> Yeast Plasmid Isolation Kit* (MP Biomedicals GmbH). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. 7 bis 10  $\mu$ l des Eluats wurden standardmäßig zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen, Life Technologies Corp.) verwendet.

---

### 3.1.11 Präparation genomischer DNA aus Hefezellen

---

Zur Präparation von genomischer DNA aus Hefezellen wurde das kommerzielle System *Yeast DNA Extraction Kit* der Firma Fisher Scientific GmbH verwendet. Die Durchführung wurde mit den im Kit enthaltenen Puffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Präparation wurden 10 ml einer stationär wachsenden Hefekultur verwendet.

---

### 3.1.12 Plasmidkonstruktion mittels homologer Rekombination in Hefezellen

---

Da Doppelstrangbrüche den Mechanismus der homologen Rekombination in Hefezellen initiieren<sup>122, 123</sup>, wurde dieser zur Klonierung und Konstruktion von Plasmiden verwendet<sup>124</sup>. Die Co-Transformation eines linearisierten Plasmids und eines PCR-Produkts mit homologen Sequenzbereichen zu diesem Plasmid ermöglichte die Reparatur des linearisierten Plasmids in der Hefezelle über die homologen Sequenzbereiche mit dem PCR-Produkt. Mittels *Gap-Repair* PCR (Kapitel 3.3.3) wurde der zu klonierende Sequenzbereich mit 40 bis 50 bp langen homologen Sequenzbereichen zum relevanten Sequenzbereich des linearisierten Plasmids amplifiziert und über das *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega GmbH) nach Herstellerangaben gereinigt (Kapitel 3.3.13). Die Überprüfung der PCR erfolgte durch Analyse der Größe der PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.3.7). Die

Linearisierung des Plasmids erfolgte durch die Restriktion mit geeigneten Restriktionsendonukleasen, die für jede Klonierung spezifisch gewählt wurden (Kapitel 3.3.6). Die Linearisierung wurde mit zwei Restriktionsendonukleasen durchgeführt, die so gewählt wurden, dass das herausgeschnittene Sequenzsegment eine Größe  $< 100$  bp aufwies, um es im nachfolgendem Reinigungsschritt mittels *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega GmbH) vom linearisierten Plasmid abzutrennen. War diese Möglichkeit nicht gegeben und das herausgeschnittene Fragment  $> 100$  bp wurde der Restriktionsansatz im Anschluss mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und das linearisierte Plasmid aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mittels *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega GmbH) aus diesem nach Herstellerangaben eluiert (Kapitel 3.3.8).

Bestand nicht die Möglichkeit das Plasmid zu linearisieren, da keine Erkennungssequenzen für geeignete Restriktionsendonukleasen vorhanden waren, wurde eine Erkennungssequenz mittels *QuikChange<sup>™</sup> site-directed Mutagenesis Kit* (Kapitel 3.3.5.1) generiert und das Plasmid anschließend über diese Restriktionsschnittstelle linearisiert (Kapitel 3.3.6).

---

### 3.1.13 Heterologe Genexpression in Hefezellen

---

Die Expression von Oberflächen-präsentierten Aga2p-Fusionen und die nicht-kovalente Oberflächenexpression von VHH-Fc Fusionsproteinen und IgG-Molekülen vermittelt durch die Fc-Bindedomäne wurde in dem *S. cerevisiae* Stamm EBY100 (Invitrogen, Life Technologies Corp.) durchgeführt. Hierfür wurden Teile des von Chao und Mitarbeitern etablierten Protokolls<sup>125</sup> und Teile des von Rakestraw und Mitarbeitern etablierten Protokolls<sup>126</sup> verwendet. Die Oberflächenpräsentation von Aga2p-Z und Aga2p-ZZ Fusionsproteinen wurde wie folgt durchgeführt:  $2,5 \times 10^8$  Zellen einer stationär wachsenden Glukose-haltigen SD-Vorkultur wurden bei 1600 g für 5 Minuten pelletiert und einmal mit 5 ml geeignetem Galaktose-haltigem SD-Medium gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 ml geeignetem Galaktose-haltigem SD-Medium resuspendiert und in einen 250 ml Schüttelkolben mit Schikane überführt und für die gewünschte Dauer (24 bis 72 Stunden) bei 20 °C oder 25 °C und 180-250 Upm inkubiert. Die nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von Aga2p-ZZ und VHH-Fc wurde in vergleichbarer Weise durchgeführt. Dem Medium wurde zusätzlich 11% (w/v) Polyethylenglykol 8000 (nachfolgend: +PEG8000) zugesetzt. Zusätzlich wurde eine höhere initiale Zelldichte der Expressionskultur von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml inokuliert. Die lösliche Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen wurde bevorzugt in dem *S. cerevisiae* Stamm APO-E durchgeführt. Die Expression erfolgte wie bereits zuvor beschrieben in

Galaktose-haltigem SD-Medium +PEG8000 mit einer Zelldichte  $1 \times 10^7$  Zellen/ml für 48 bis 120 Stunden. Vereinzelt wurde die Expression in einem kleinen Volumen von 3 ml in der Vertiefung einer 6-well Platte oder in 20 ml in einer Petrischale durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine initiale Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt und die 6-well Platte und die Petrischale in ein verschließbares Plastikgefäß gestellt, welches zum Erhalt der Luftfeuchtigkeit mit befeuchtetem Zellstoff ausgelegt war. Das Plastikgefäß wurde in einen temperierten Inkubationsschrank gestellt und bei 20 °C für maximal 120 Stunden ohne Schütteln kultiviert.

---

### 3.1.14 Oberflächenpräsentation der VHH-Bibliotheken

---

Eingefrorene VHH-Fc Bibliotheken wurde aus dem Gefrierschank genommen, bei 30 °C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in 1 L geeignetem SD-Medium resuspendiert und in einem 3 L Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt. Im Anschluss wurden die Zellen 24 Stunden bei 30 °C und 250 Upm im Schüttelinkubator inkubiert. Nachfolgend wurde die Zelldichte der Kultur bestimmt (Kapitel 3.1.7) und  $1 \times 10^{10}$  Zellen bei 1600 g für 5 Minuten pelletiert und mit 50 ml Galaktose-haltigem SD-Medium +PEG8000 gewaschen. Es schloß sich das Resuspendieren der Zellen in 1 L des Galaktose-haltigen SD-Mediums +PEG8000 an, um die Oberflächenpräsentation zu induzieren. Die Zellen wurden sodann zur Genexpression bei 20 °C und 180 - 250 Upm im Schüttelinkubator inkubiert. Das Ende der Expression wurde durch Markierung und Analyse der Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine mit dem Fc-spezifischem Nachweisantikörper (Ziege anti-Human IgG, Fc-Fragment spezifisch F(ab')<sub>2</sub> Dylight™ 649-Konjugat bzw. AlexaFluor™ 647-Konjugat) im Durchflusszytometer festgestellt. Die durchschnittlichen Expressionszeiten lagen zwischen 24 und 72 Stunden.

---

### 3.1.15 Fluoreszenzmarkierung Oberflächen-präsentierter Proteine auf Hefezellen

---

Der Nachweis Oberflächen-präsentierter Proteine auf EBY100-Zellen erfolgte durch Fluoreszenzmarkierung der Zellen, einerseits mit Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern, die Epitope auf den exponierten Proteinen detektierten, andererseits durch die funktionelle Bindung der präsentierten Proteine an das spezifische biotinylierte Zielprotein (Antigen). Die Analyse der markierten Zellen erfolgte im Durchflusszytometer Guava easyCyte 6HT 2L (Merck Millipore, Merck KGaA). Die Bestimmung der Effizienz der Oberflächenpräsentation von nicht-kovalent präsentierten VHH-Fc Proteine erfolgte über die Markierung mit einem

Dylight™ 649- bzw. AlexaFluor™ 647-konjugiertem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment aus der Ziege. Die Markierung der Z- und ZZ-Domäne erfolgte über einen polyklonalen Protein-A spezifischen FITC-konjugierten Antikörper aus der Ziege. Alle zur Markierung verwendeten Antikörper wurden 1 zu 10 verdünnt eingesetzt. Die zur Markierung verwendeten Zielproteine (Antigene) wurden mit einer Konzentration von 1 µM bzw. 1,2 µM verwendet. Die Inkubationsschritte wurden auf Eis und bei Verwendung von fluoreszierenden Nachweisreagenzien abgedunkelt durchgeführt.

Für durchflusszytometrische Analysen wurden standardmäßig  $1 \times 10^7$  Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 8000 Upm für eine Minute in der Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand verworfen, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und in 20 µl einer Antikörper- oder Zielproteinlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss 15 Minuten inkubiert und erneut einmal mit PBS gewaschen. Im Fall der Markierung mit biotinylierten Zielprotein wurden die Zellen anschließend in 20 µl Streptavidin-R-Phycoerythrin-Konjugat (1 zu 10 verdünnt) resuspendiert und erneut 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in 100 µl PBS resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C abgedunkelt gelagert.

Bei einer Zweifarben-Markierung von Oberflächen-präsentierten IgG-Molekülen und VHH-Fc Fusionsproteinen über die ZZ-Domäne wurden die Zellen zuerst mit dem biotinylierten Zielprotein inkubiert und nach dem Waschen mit PBS mit einer Mischung aus Streptavidin-R-Phycoerythrin (1 zu 10 verdünnt) und dem Dylight™ 649- bzw. AlexaFluor™ 647-konjugiertem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment aus der Ziege inkubiert. Die gewaschenen Zellen wurden in 100 µl PBS resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C abgedunkelt gelagert. 1 µl der Zellsuspension wurden in 200 µl PBS verdünnt und für die Messung im Durchflusszytometer Guava easyCyte 6HT 2L (Merck Millipore, Merck KGaA) verwendet.

---

### 3.1.16 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung

---

Die MACS (*Magnetic-activated Cell Sorting*) wurde mit paramagnetischen Partikeln, dem MACS Separator und unter Verwendung von LS-Säulen (Miltenyi Biotech GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Hefezellen wurden standardmäßig für 5 min bei 1600 g zentrifugiert und zwischen den verschiedenen Inkubationsschritten mit einem ausreichenden Volumen PBS gewaschen. Das Verfahren wurde zur Anreicherung von Zielzellen während verschiedener Mischungsexperimente verwendet. Im Vorfeld wurden die Zellen in geeigneter Weise je nach Anwendung mit Cetuximab (1 µM) und/oder biotinyliertem Antigen b-hsEGFR

(1  $\mu\text{M}$ ) markiert. Die Markierung der Zellen mit magnetischen Partikeln erfolgte im Anschluss mit Streptavidin-konjugierten *MicroBeads* (10  $\mu\text{l}$ /10<sup>7</sup> Zellen) bei 4 °C unter ständiger Rotation für 30 Minuten. Zellmengen  $<5 \times 10^8$  wurden in 50 ml PBS, Zellmengen zwischen  $5 \times 10^8$  und  $1 \times 10^9$  in 100 ml PBS resuspendiert. Zur Zellseparation wurden LS-Säule in das magnetische Feld des MACS Separators gebracht und die Säule einmalig mit 3 ml PBS gewaschen. In Fraktionen von 7 ml wurde im Anschluss die Zellsuspension über die Säule gegeben. Vor jedem Auftrag auf die Säule wurden die Zellen kurz resuspendiert und die Säule mit 1 ml PBS gewaschen. Zur Reorientierung der Zellen wurde die Säule vor dem Auftrag jeder neuen Fraktion kurzzeitig aus dem magnetischen Feld entfernt. Abschließend wurde die Säule mit 3 ml PBS gewaschen. Die Säule wurde aus dem magnetischen Feld des Separators gebracht und mit 7 ml PBS befüllt. Mit einem geeigneten Spritzenkolben wurden die Zellen in ein 15-ml Falcon eluiert. Das Eluat wurde anschließend zur Herstellung geeigneter Verdünnungen verwendet um die Anreicherung der Zielzellen durch das Auszählen dieser Verdünnungsplattierungen zu bestimmen. Der Rest des Eluats wurde in geeignetes Glukosehaltiges SD-Medium überführt und 24 bis 48 Stunden bei 30 °C im Schüttelschrank inkubiert.

### 3.1.17 Durchflusszytometrie und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Durchflusszytometrische Analysen von Fluoreszenz-markierten Hefezellen wurden im Guava easyCyte 6HT 2L System (Merck Millipore, Merck KGaA) durchgeführt. Die Datenaufnahme und Analyse erfolgte mit dem Programm *Guava easCyte Express Pro* (GuavaSoft v1.2). Bei jeder Analyse wurden 5.000 Ereignisse mit einer Frequenz  $\leq 500$  Ereignisse/Sekunde vermessen.

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung erfolgte im MoFlo<sup>®</sup> Zellzytometer (Beckman Coulter GmbH). Zur Justierung der Strahlengänge des Lasers (488 nm und 640 nm) wurden fluoreszierende *Flow-Check<sup>™</sup> Fluorospheres* (Beckman Coulter GmbH) und *AlignFlow<sup>™</sup> alignment beads* 630 – 660 nm (Life Technologies Corp.) verwendet. Die Photomultiplier (PMT) wurden, wenn nicht anders vermerkt, auf folgende Werte eingestellt: FL2 400 (R-Phycoerythrin-Konjugat), FL8 600 (AlexaFluor<sup>™</sup> 647- bzw. Dylight<sup>™</sup> 649-Konjugat). Die maximale Ereignisanzahl wurde auf 15.000 Ereignisse/Sekunde beschränkt. Datenerfassung und -auswertung erfolgte mit dem Programm *Summit<sup>®</sup>* v4.3.

Für die Sortierung von Fluoreszenz-markierten Hefezellen wurde zusätzlich zur Justierung der Strahlengänge der Tropfenabrisspunkt eingestellt und die Tropfenverzögerung festgelegt. Zur Definition des Sortfensters wurden geeignete Positiv- und Negativkontrollen vermessen.

---

Zellen innerhalb des Sortfensters wurden in Auffanggefäße sortiert, die mit PBS gefüllt waren oder alternativ mittels CyClone® Sortiereinheit zur Einzelzellablage auf Selektivagarplatten vereinzelt. Während Sortierungen wurde darauf geachtet, dass bei geringem Probendruck eine Frequenz von 10.000 Ereignissen/Sekunde nicht überschritten wurde.

---

### 3.1.18 Fluoreszenzmikroskopie

---

Zur Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung von Hefezellen wurde das Mikroskop Axiostar plus (Carl Zeiss AG) verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine geeignete Menge der gewünschten Zellsuspension auf einen Objektträger übertragen, mit einem Deckglas bedeckt und auf dem Objekttisch des Mikroskops arretiert. Die Analyse erfolgte unter Verwendung eines 100× Objektivs und Immersionsöl. Es wurden Durchlichtaufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen der gewünschten Fluoreszenz (SA-PE und AlexaFluor™ 647) unter Verwendung geeigneter Filter angefertigt. Zu Dokumentation wurde die Mikroskopkamera AxioCam (Carl Zeiss AG) und das Computerprogramm AxioVision v4.8.2 verwendet.

---

### 3.1.19 Dialyse von Kulturüberständen

---

Zur Dialyse von Überständen aus Hefe-Expressionskulturen wurden Dialyseschläuche (*SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing*, Thermo Scientific GmbH) mit einer molekularen Ausschlussgröße von 10 kD verwendet. Zu diesem Zweck wurde der Kulturüberstand mittels Zentrifugation (1600 g, 5 min) von den Hefezellen getrennt und in ein auf einer Seite verschlossenes, ca. 15 cm langes Stück des Dialyseschlauches überführt. Optional wurde der Überstand vor der Dialyse mit PIC III (*Protease Inhibitor Cocktail III*) 1 zu 1000 verdünnt versetzt. Im Anschluss wurde der Dialyseschlauch auf der offenen Seite ebenfalls verschlossen und mit einem Schaumstoffschwimmer in ein mit 10 L PBS befülltes Gefäß gehängt. Die Dialyse erfolgte standardmäßig für 16 Stunden bei 4 °C unter leichtem Rühren (100 Upm) auf einem Magnetrührer. Nach Abschluss der Dialyse wurde der Inhalt der einzelnen Dialyseschläuche in einem Becherglas vereinigt. Routinemäßig wurde der so vorbereitete Kulturüberstand für die Protein A Affinitätschromatographie (Kapitel 3.2.1) verwendet. Zur Analyse wurde vor und nach der Dialyse je 1 ml des Überstandes abgenommen und für die Analytik mittels LDS-PAGE (Kapitel 3.2.9) und Western-Blot (Kapitel 3.2.11) aufgearbeitet.

---

## 3.2 Biochemische Methoden

---

### 3.2.1 Protein A-Affinitätschromatographie

---

Zur Reinigung von VHH-Fc Fusionsproteinen aus Kulturüberständen wurde eine Protein A-Affinitätschromatographie durchgeführt. Zur Automatisierung wurde das Äkta™prime System mit der Software Prime View™ 5.0 und Protein A HiTrap™ 1 ml Säulen (GE Healthcare Europe GmbH) verwendet.

Zum Spülen der Systemschläuche wurde Ethanol (20%), steriles Wasser und Puffer A und B verwendet. Hierzu wurde am Gerät die Methode „System Wash Method“ ausgewählt. Die Protein A Säule wurde anschließend mit 30 ml Puffer A (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × H<sub>2</sub>O, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2H<sub>2</sub>O, 3,5 M NaCl, pH 7,4) äquilibriert. Im Anschluss erfolgte der Probenaufrag des dialysierten Kulturüberstandes auf die Säule mit einer Flussrate von 1 ml/min. Zuvor wurde der pH-Wert der Probe mittels pH-Meter überprüft und gegebenenfalls auf einen pH-Wert von 7,0 – 7,4 mit 1 N NaOH oder 1 M HCl eingestellt. Während des Probenaufrags wurde für analytische Zwecke eine Probe des Säulendurchbruchs genommen und aufbewahrt. Die Elution des VHH-Fc Fusionsproteins von der Säule wurde mit Puffer B (100 mM Zitronensäure, pH 2,7) durchgeführt. Vor der Elution wurden 100 µl Tris-HCl (pH 9) in die Auffangröhrchen der Fraktionssammel-Einheit pipettiert. Bei Stillstand des Äkta™prime Systems wurden das System mit 20% Ethanol befüllt. Die Steuerung des Systems erfolgte am Gerät. Im direkten Anschluss wurden die relevanten Elutionsfraktionen nach Sichtung des Chromatogramms vereinigt und mittels PD-10 Säulen (Merck Millipore, Merck KGaA) umgepuffert.

---

### 3.2.2 Pufferaustausch mit PD-Säulen

---

PD-10 Säulen wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Fraktionen aus Kapitel 3.2.1 wurden mittels Centricon-Konzentratoren (MW 10 kDa) auf 2,5 ml ankonzentriert und auf die vorher mit 25 ml PBS equilibrierte PD-10 Säule gegeben. Der Durchbruch wurde verworfen. Zur Elution wurden 3,5 ml PBS auf die Säule gegeben und die Elution in Fraktionen à 500 µl aufgefangen. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte im Anschluss mittels LDS-PAGE (Kapitel 3.2.9). Die Fraktionen, die das gewünschte Protein in ausreichender Reinheit enthielten, wurden vereinigt.



---

### 3.2.3 Deglykosylierung von Proteinen mittels Endoglykosidase H

---

Die Verwendung der Endoglykosidase H erfolgte nach Herstellerangaben (New England Biolabs GmbH). Die Puffer (Denaturierungspuffer und Reaktionspuffer G5) waren im Kit enthalten und wurden vom Hersteller bezogen. 2  $\mu\text{g}$  des Proteins wurden in 10  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser verdünnt und mit 1  $\mu\text{l}$  Denaturierungspuffer versetzt. Es schloss sich eine 10-minütige Inkubation bei 99 °C im Heizblock an. Nach dem Abkühlen bei 4 °C wurde die Probe mit 1  $\mu\text{l}$  des Enzyms EndoH (Endoglykosidase H) und 1  $\mu\text{l}$  des G5 Reaktionspuffers versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Probe wurde im Anschluss wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben für die Analyse mittels LDS-PAGE aufgearbeitet.

---

### 3.2.4 Biotinylierung von Proteinen mit Sulfo-NHS-Biotin

---

Die Biotinylierung von hEGFR, mmEGFR und rFcRn wurde mit dem kommerziell erhältlichen System *EZ-Link<sup>®</sup> Micro Sulfo-NHS-Biotinylation Kit* (Thermo Scientific GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Quantifizierung der Biotinylierung wurde mit dem *Pierce<sup>®</sup> Biotin Quantitation Kit* (Thermo Scientific GmbH) ebenfalls nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Vergleichsstandard zur Quantifizierung wurde Biotin-HRP verwendet. Der Standard und die zu messende Probe wurde in einer 96er-Platte gegeben und die Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt.

---

### 3.2.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels NanoDrop

---

Proteinkonzentrationen wurden standardmäßig aus wässrigen Lösungen im *NanoDrop ND-1000 Spektrometer* bei 280 nm bestimmt. Hierzu wurden 1,5  $\mu\text{l}$  der zu messenden Probe auf die dafür vorgesehenen Vorrichtung pipettiert und die Messung gestartet. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurden das Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient des Proteins verwendet, welche zuvor unter Verwendung von Bioinformatik-Programmen bestimmt wurden. Zuvor wurde der Wert von sterilem Wasser als Nullwert gemessen.

---

### 3.2.6 Präzipitation von Proteinen aus Kulturüberständen

---

Die Präzipitation von Proteinen aus Kulturüberständen erfolgte mittels Trichloressigsäure (TCA). Das Volumen des Kulturüberstandes, welches einer Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen



---

entsprach, wurde standardmäßig mit 100%-iger TCA-Lösung auf einen TCA-Gehalt von 20% eingestellt und 16 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 13.000 Upm für 45 Minuten in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet einmal mit 2% Natriumacetat in Ethanol gewaschen. Für die anschließende Analytik mittels LDS-PAGE und Western-Blot, wurde die gefällte Proteinprobe im Heizblock so lange bei 65 °C getrocknet, bis das Pellet trocken erschien. Anschließend wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen LDS-Probenpuffer aufgenommen und wie in Kapitel 3.2.9 erläutert aufgearbeitet.

---

### 3.2.7 Proteinpräparation aus Hefezellen

---

Um den intrazellulären Anteil an VHH-Fc Proteinen analytisch zu untersuchen, wurde eine gewünschte Zellmenge (standardmäßig  $1 \times 10^7$  Zellen) aus einer Hefekultur entnommen und bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden einmal mit 500  $\mu$ l PBS gewaschen und in 18  $\mu$ l sterilem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von  $\sim 5$  mg Glasperlen (Bio Spec Products Inc.) wurden die Zellen im *Disruptor Genie* (Scientific Industries Inc.) 15 Minuten durch starkes Schütteln aufgeschlossen. Nach Zugabe von 1  $\mu$ l Benzonase wurden die Zellen 15 Minuten bei 20 bis 22 °C inkubiert und anschließend in einem geeigneten Volumen Auftragspuffer für die LDS-PAGE aufgenommen und wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben aufgearbeitet.

---

### 3.2.8 Biolayer-Interferometrie

---

Die Quantifizierung von VHH-Fc Proteinkonzentrationen in Kulturüberständen aus Hefe-Expressionskulturen und die Bestimmung der kinetischen Konstanten von biomolekularen Interaktionen wurde mit Hilfe der Biolayer-Interferometrie im Octet RED System (FortéBio, Pall Inc.) durchgeführt. Für beide Methoden wurden standardmäßig Protein A-Biosensoren verwendet.

Im Vorfeld erfolgte die Rehydrierung der Protein A-Biosensoren in Kulturmedium oder PBS. Bei der Messung aus Kulturüberständen wurde die Rehydrierung für mindestens 45 Minuten in SD-Medium+PEG8000 durchgeführt. Bei der Verwendung von Proteinlösungen in PBS wurde die Rehydrierung für mindestens 10 Minuten in PBS durchgeführt. Zur Quantifizierung von Proteinkonzentrationen in Kulturüberständen wurden die Sensoren für 600 Sekunden mit VHH-Fc Fusionsproteinen beladen. Zu diesem Zweck wurden die rehydrierten Sensoren in die dafür vorgesehene Halterung in der Octet RED Messkammer gestellt und die vorbereiteten

zellfreien Proben des Kulturüberstandes à 200 µl in die Vertiefungen einer schwarzen Polypropylenplatte gegeben und ebenfalls in die dafür vorgesehene Halterung in der Messkammer gestellt. Die Messung wurde mit der Methode „*Basic Quantitation*“ im Programm *Octet Data Acquisition v6.4* durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten wurde mit dem Programm *Data Analysis v6.4* durchgeführt. Zur Quantifizierung der Proben wurde eine Kalibrierreihe mit Referenzproben bekannter Konzentration erstellt. Als Referenz wurde ein intern hergestelltes und zuvor gereinigtes VHH-Fc Fusionsprotein in acht verschiedenen Konzentrationen (0, 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 25 mg/L) mit Potein A-Biosensoren quantifiziert.

Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der Interaktion von VHH-Fc und hsEGFR wurde die Methode „*Basic Kinetics*“ im Programm *Octet Data Acquisition v6.4* gewählt. Die Sensoren wurden in gleicher Weise wie zur Quantifizierung vorbereitet und mit dem VHH-Fc Fusionsprotein beladen. Dies erfolgte entweder mit Überständen aus Expressionskulturen oder mit zuvor gereinigtem Protein bekannter Konzentration, welches in PBS vorlag. Folgende Einstellungen des Gerätes wurden gewählt:

**Tab. 3.1: Programm zur Analyse der hsEGFR : VHH-Fc Bindung.**

Schritt	Lösung	Zeit [Sek.]	Upm
Beladung	PBS o. Medium	600	1000
Waschschritt 1	PBS	60	1000
Waschschritt 2 (optional)	PBS	180	1000
Basislinie	PBS	180	1000
Assoziation	Analyt in PBS	180	1000
Dissoziation	PBS	360	1000

Alle Messungen wurden bei 24 °C durchgeführt. Waschschritt 2 erfolgte nur bei Verwendung von Kulturmedium zur Beladung. Zur Assoziation wurde hsEGFR in verschiedenen Konzentrationen verwendet (1000, 500, 250, 125, 62,5, 15,6, 3,9 nM). Die Prozessierung und Analyse der Rohwerte erfolgte unter Abzug der Messwerte der jeweiligen Negativkontrolle mit dem Programm *Octet Data Analysis v6.4* unter Verwendung des „*global Fitting*“ Algorithmus unter der Annahme eines stöchiometrischen Verhältnisses von 1:1. Zu diesem Zweck wurden die prozessierten Werte auf die Basislinie und die Dissoziation angeglichen.

---

### 3.2.9 Polyacrylamidgelelektrophorese

---

Die Analyse von Proteinen erfolgte mit einer Abwandlung der denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE), in welcher Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt wurden<sup>127</sup>. Es wurde das von Invitrogen erhältliche pH-neutrale NuPAGE® Elektrophorese-System verwendet, in welchem anstelle von SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) LDS (Lithium Dodecyl Sulfat) als anionisches Detergenz und zusätzlich Fertiggele verwendet. Zuvor vorbereitete Proteinproben wurden mit geeigneten Volumina NuPAGE® LDS Sample Buffer (4×) und ggf. NuPAGE® LDS Sample Reducing Agent (10×) versetzt und 15 Minuten bei 90 °C inkubiert. Die Auftrennung erfolgte unter Verwendung von NuPAGE® Novex 4-20% Bis-Tris Fertiggele zusammen mit 10 µl SeeBlue® Plus 2 Pre-Stained Proteinmarker bei 200 V für 35 Minuten in einer Elektrophoresekammer. Als Laufpuffer wurde NuPAGE® MES SDS Puffer verwendet. Im Anschluss wurden die Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (Kapitel 3.2.10) oder die Proteine mittels iBlot® (alles Invitrogen, Life Technologies Corp.) auf eine PVDF-Membran für weitere Analysen mittels Western-Blot transferiert (Kapitel 3.2.11)

---

### 3.2.10 Coomassie-Färbung von Proteingelen

---

Proteine wurden im Polyacrylamidgel durch die Färbung mit einer Coomassie-Lösung sichtbar gemacht<sup>128</sup>. Zu diesem Zweck wurde das Gel unter ständigem Schwenken mit Coomassie-Färbelösung (s. Kapitel 2.10) für eine Stunde inkubiert. Zum Entfärben des Gels schloss sich eine 2 bis 6-stündige Inkubation mit Entfärberlösung (10% Essigsäure, 20% Ethanol) an. Das entfärbte Gel wurde optional weitere 12 Stunden in sterilem Wasser inkubiert, bis der Hintergrund komplett entfärbt war. Für Dokumentationszwecke wurde das Gel gescannt und archiviert. Alternativ wurden Polyacrylamidgele auch mit dem Reagenz InstantBlue™ zur Visualisierung der Proteine inkubiert. Zu diesem Zweck wurde das Gel in der InstantBlue™ Lösung für eine Stunde inkubiert. Durch die Verwendung von InstantBlue™ (Expedeon Ltd.) war eine nachfolgende Entfärbung des Gels nicht mehr nötig.

---

### 3.2.11 Western-Blot Analyse

---

Zur immunologischen Analyse von mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteinen wurden diese mittels iBlot® 7-Minute Blotting System auf eine PVDF-Membran<sup>129</sup> übertragen und immobilisiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers

---

(Invitrogen, Life Technologies Corp.). Zur immunologischen Detektion von immobilisierten Proteinen auf der PVDF-Membran wurde diese mit spezifischen Nachweisantikörpern inkubiert und die Proteine durch eine Enzymreaktion sichtbar gemacht<sup>130</sup>.

VHH-Fc-Fusionsproteine wurden durch einen human IgG-spezifischen Hase-Antikörper und einen Hase-spezifischen POD-konjugierten Antikörper aus der Ziege markiert. Zur Inkubation der PVDF Membran mit den Antikörpern (1:10 verdünnt) wurde die Western-Blot Antikörperlösung (Kapitel 2.10) verwendet. Zwischen den Inkubationsschritten und vor der Enzymreaktion wurde die Membran mit Waschpuffer (Kapitel 2.10) gewaschen. Zur Visualisierung der markierten Proteine mittels Enzymreaktion wurde das TMB Substrat Kit für Peroxidase (Vector Laboratories Ltd.) nach Herstellerangaben verwendet. Nach Abstoppen der Reaktion mit sterilem Wasser wurde die gefärbte Membran bei 20 bis 22 °C im Dunkeln getrocknet und für Dokumentationsschritte gescannt und aufbewahrt.

---

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

---

---

#### 3.3.1 Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen

---

Die Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch den Zusatz von monovalenten Kationen und Alkohol. Die Methode diente der Konzentrierung von DNA und dem Entfernen von Salzen, Nukleotiden und Proteinen. Die Probe wurde mit 1/10 Vol. 7 M Natriumacetat und 3 Vol. Ethanol (96%) versetzt und unter starkem Schütteln durchmischt. Zur Fällung der DNA wurde die Probe eine Stunde bei -20 °C inkubiert und anschließend eine Stunde bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde einmalig mit 70% Ethanol gewaschen und mit geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes im Heizblock bei 65 °C für ~10 Minuten getrocknet. Im Anschluss wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen sterilem Wassers resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

---

#### 3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

---

Die Polymerase-Kettenreaktion<sup>131-133</sup> (PCR) wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten verwendet. Es wurde zwischen drei anwendungsspezifischen Ansätzen unterschieden, die in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben sind. Methoden zur Mutagenese von DNA-Fragmenten sind separat aufgeführt (Kapitel 3.3.5). Standardmäßig wurden alle Pipettierschritte auf Eis durchgeführt und das Enzym erst kurz vor Beginn der Reaktion hinzugegeben.

---

#### 3.3.3 *Gap-Repair* PCR

---

Zu klonierende DNA-Fragmente mittels homologer Rekombination in Hefezellen wurden mittels PCR unter Verwendung von *Gap-Repair* Oligodesoxyribonukleotiden (Kapitel 2.6) hergestellt. Zur Amplifizierung wurde die *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity (HF) DNA Polymerase* (Thermo Scientific GmbH) verwendet, die sich laut Herstellerangaben durch eine äußerst geringe Fehlerrate auszeichnete. Pro Kilobase wurde eine Elongationszeit von 15 Sekunden gewählt. Der PCR-Ansatz umfasste ein Volumen von 50 µl und wurde in mehrfacher Ausführung angefertigt, um eine ausreichende Ausbeute des PCR-Produktes zu erzielen. Standardmäßig wurden 16 Reaktionsansätze angefertigt. Die Reaktion wurde in einem *Thermocycler* mit Deckelheizung durchgeführt. Zur Amplifizierung wurde entweder ein einstufiges (Tab. 2.2) oder ein zweistufiges (Tab. 2.3) PCR-Programm gewählt.

Tab. 3.2: PCR-Ansatz *Gap-Repair*.

PCR-Ansatz		finale Konz.
DNA-Matrize	50 – 100 ng	~
Phusion® HF DNA Polymerase	1 µl (2 U)	0,04 U/µl
dNTP`s	1 µl (10 mM)	0,2 mM/dNTP
Phusion® HF Puffer	10 µl (5 ×)	1 ×
Oligodesoxyribonukleotid <i>up</i>	1 µl (10 µM)	0,2 µM
Oligodesoxyribonukleotid <i>rev</i>	1 µl (10 µM)	0,2 µM
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	-

Tab. 3.3: 1-Stufen PCR-Programm *Gap-Repair*.

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	30 s	
Hybridisierung	variabel	30 s	30 ×
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Ende	4 °C	variabel	

Tab. 3.4: 2-Stufen PCR-Programm *Gap-Repair*.

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
Denaturierung	98 °C	15 s	
Hybridisierung	variabel	15 s	10 ×
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Denaturierung	98 °C	15 s	
Hybridisierung	65 °C	15 s	20 ×
Elongation	72 °C	15 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Ende	4 °C	variabel	

### 3.3.4 PCR zur Analyse von Klonierungsprodukten

Zur Analyse von Klonierungsprodukten wurde die *AmpliTaQ DNA Polymerase* (Life Technologies Corp.) verwendet. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug 20  $\mu\text{l}$  und wurde wie in Tab. 3.5 aufgelistet zusammengestellt. Als DNA-Matrize wurde zuvor isolierte Plasmid-DNA aus Hefe- oder *E. coli* Zellen eingesetzt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tab. 3.6 dargestellt.

Tab. 3.5: PCR-Ansatz zur Analyse von Klonierungsprodukten.

PCR-Ansatz		Finale Konz.
DNA-Matrize	50 – 100 ng	~
AmpliTaQ DNA Polymerase	1 $\mu\text{l}$ (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,25 U/ $\mu\text{l}$
dNTP`s (Mix)	1 $\mu\text{l}$ (10 mM)	0,2 mM/dNTP
PCR Reaktionspuffer	2 $\mu\text{l}$ (10 $\times$ )	1 $\times$
Oligodesoxyribonukleotid for	1 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{M}$
Oligodesoxyribonukleotid rev	1 $\mu\text{l}$ (10 $\mu\text{M}$ )	0,2 $\mu\text{M}$
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$	-

Tab. 3.6: PCR-Programm zur Analyse von Klonierungsprodukten.

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	1 min	
Denaturierung	98 °C	1 min	
Hybridisierung	variabel	30 s	30 $\times$
Elongation	72 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Ende	4 °C	variabel	

### 3.3.5 Mutagenese von DNA-Sequenzen

DNA-Fragmente wurden für verschiedene Zwecke mutagenisiert. Zur gezielten und ortsgerichteten Mutagenese wurde das *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies Inc.) verwendet. Zur zufälligen Mutagenese von DNA-Abschnitten mittels *Error-prone* PCR wurde das *GeneMorph® II Random Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies Inc.) verwendet. Letztere wurde zur Erstellung der *Error-prone*-basierten VHH-Bibliotheken verwendet. Beide Methoden sind im Folgenden näher erläutert.

### 3.3.5.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglichte die gezielte Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleinbasen während der PCR. Die Durchführung erfolgte mit dem *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis* Kit nach Herstellerangaben (Agilent Technologies Inc.). Mit Hilfe dieser Methode wurde in die Sequenz des Gal1-Promotors im Plasmid *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *KpnI* eingefügt. Zur Mutagenese wurden die Oligodesoxyribonukleotide *pGal-KpnI-up* und *pGal-KpnI-rp* verwendet. Die ortsspezifische Mutagenese wurde zusätzlich für die Mutagenese des Fc-Teils in allen hier verwendeten Plasmiden zur löslichen Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen oder IgG-Molekülen eingesetzt. Durch die Verwendung des Oligodesoxyribonukleotids *N-Q-HC-mut* wurde das Kodon AAC gegen das Kodon CAG ersetzt. In beiden Fällen wurde folgender PCR-Ansatz hergestellt:

**Tab. 3.7: PCR-Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese.**

Komponenten	Vol.
10 × QuikChange® Multi Reaktionspuffer	2,5 µl
QuikSolution	0,75 µl
DNA Matrize	100 ng
Oligodesoxyribonukleotid	100 ng
dNTP Mix	1 µl
QuikChange® Multi Enzyme Blend (2,5 U/µ)	1 µl
steriles Wasser	ad 50 µl

**Tab. 3.8: PCR-Programm für die ortsspezifische Mutagenese.**

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	1 min	
Hybridisierung	55 °C	1 min	30 ×
Elongation	65 °C	2 min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

Nach Abschluss der Mutagenese wurde der Ansatz 2 Minuten auf Eis inkubiert und zum endonukleolytischen Verdau der Matrizen-DNA mit 1 µl *DpnI* versetzt und 16 Stunden bei 20 °C bis 22 °C inkubiert. Chemisch kompetente *E. coli* TOP10-Zellen wurden anschließend mit 1,5 µl des Restriktionsansatzes transformiert (Kapitel 3.1.2). Nach Plasmidvermehrung und Isolierung der DNA aus *E. coli* (Kapitel 3.1.3) erfolgte die Überprüfung des relevanten DNA-Abschnitts mittels Sequenzierung (Kapitel 3.3.14).



### 3.3.5.2 Error-prone PCR

Mit Hilfe des *GeneMorph® II Random Mutagenesis Kits* (Agilent Technologies Inc.) wurden während einer PCR zufällig Mutationen in einen mit Oligodesoxyribonukleotiden definierten Plasmid-Abschnitt eingeführt. Die Mutationen wurden durch die Verwendung der DNA-Polymerase *Mutazyme® II* unter geeigneten Reaktionsbedingungen erzielt. Hier wurden die vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gewählt. Um hohe Mutationsraten von bis zu 16 Mutationen/kb zu erzielen, wurden initial 10 ng des zu mutierenden DNA-Abschnitts eingesetzt und eine hohe Zyklenzahl während der PCR gewählt (s. Tab. 3.10).

**Tab. 3.9: Ansatz für die *Error-prone* PCR.**

Komponenten	Vol.
10× Mutazyme® II Reaktionspuffer	5,0 µl
40 mM dNTP mix	1,0 µl
DNA Matrize (10 ng)	1,0 µl
Oligodesoxyribonukleotid Mix (je 250 ng/µl)	0,5 µl
Mutazyme® II DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1,0 µl
steriles Wasser	ad 50 µl

**Tab. 3.10: *Error-prone* PCR-Programm.**

PCR-Programm	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
Hybridisierung	55 °C	30 s	30 ×
Elongation	72 °C	1 min/≤kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

### 3.3.6 Endonukleolytische Restriktion von DNA

Die endonukleolytische Spaltung von DNA wurde mit diversen Enzymen (New England Biolabs GmbH) durchgeführt. Es wurden die jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen gewählt. Für analytische und kleinere präparative Ansätze wurden 5 bis 10 µg DNA mit der empfohlenen Menge Enzym und NEB Puffer versetzt und mit sterilem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Große Ansätze mit bis zu 500 µg DNA wurden in einem Volumen von 500 - 1000 µl durchgeführt. In diesem Fall erfolgte die Restriktion für 24 Stunden bei 20 °C bis 22 °C. Falls eine Hitzeinaktivierung des Enzyms möglich war, wurde diese im Heizblock

---

bei 65 °C durchgeführt. Die Analyse der endonukleolytischen Restriktion von DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Kapitel 3.3.7).

---

### 3.3.7 Agarosegelelektrophorese

---

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel mit TAE-Laufpuffer. Zur Größenabschätzung wurde der Größenstandard *Novagen<sup>®</sup> Perfect DNA<sup>™</sup> Marker* (Merck Millipore, Merck KGaA) mit aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld (100 V, 400 mA, 50 min), wobei sich negativ geladene DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte mit verschiedenen Geschwindigkeiten in der Agarosematrix bewegten. Zur Visualisierung der Größenauftrennung wurde das Agarosegel 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Die anschließende Detektion mittels UV-Licht erfolgte im UV-Transilluminator (Syngene Synoptics Ltd.).

---

### 3.3.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

---

Mit dem Gelextraktionskit *Wizard<sup>®</sup> SV Gel & PCR Clean-up System* (Promega GmbH) konnten gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente verschiedener Größe aus einem Agarosegel isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Im Anschluss wurde die Konzentration der isolierten DNA-Lösung mittels NanoDrop ND-100 Spektrometer (Kapitel 3.3.9) bestimmt und diese, falls nicht sofort verwendet, bei -20 °C gelagert.

---

### 3.3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

---

Die Bestimmung der Konzentration von wässrigen DNA-Lösungen erfolgte mittels NanoDrop ND-100 Spektrometer (Thermo Scientific GmbH) bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Herstellerangaben. Zu diesem Zweck wurde 1,5 µl der DNA-Lösung auf die davor vorgesehene Vorrichtung pipettiert und die Messung gestartet.

---

### 3.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

---

Zur Ligation von kompatiblen DNA-Fragmenten wurde standardmäßig die T4-DNA Ligase (New England Biolabs GmbH) verwendet. Sie katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phospho-diesterbindung zwischen einer 5'-Phosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe und

ermöglicht so die Verbindung von kompatiblen DNA-Enden. Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und 16 Stunden im temperierten Wasserbad bei 16 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 3.11 gezeigt. Die einzusetzenden DNA-Mengen wurden wie folgt mit Gleichung (1) berechnet, um einen dreifach-molaren Überschuss an Insert DNA zu erhalten:

$$\text{Insert DNA (ng)} = \frac{3 \times \text{Plasmid DNA (ng)} \times \text{Insert DNA (bp)}}{\text{Plasmid DNA (bp)}} \quad (1)$$

**Tab. 3.11: Ligationsansatz für die Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase.**

Reagenz	Vol.	Konz.
Plasmid-DNA	150 – 300 ng	~
Insert-DNA	~	~
T4-Ligase Puffer (5 ×)	4 µl	1 ×
T4-DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl	0,05 U/µl
steriles Wasser	ad 20 µl	-

2 µl des Reaktionsansatzes wurden zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen verwendet (Kapitel 3.1.2).

### 3.3.11 Klonierung von PCR-Produkten mit TA-Überhang

Die Methode der TA-Klonierung wurde zur effizienten Subklonierung von *Error-prone* PCR-Produkten mit 3'-A Überhängen verwendet, die während der Amplifizierung mittels *Mutazyme® II DNA Polymerase* generiert wurden. Es wurde das *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* (Invitrogen, Life Technologies Corp.) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die so generierten Klonierungsprodukte konnten anschließend zur Überprüfung der Mutagenese sequenziert werden. 3 µl des *Error-prone* PCR-Ansatzes wurden mit 1 µl *pCR® 2.1-TOPO*, 1 µl Salzlösung und 1 µl sterilem Wasser gemischt und fünf Minuten bei 20 °C bis 22 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl des Ansatzes für die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10-Zellen (Invitrogen, Life Technologies Corp.) verwendet (Kapitel 3.1.2).

### 3.3.12 Klonierung von *blunt-end* PCR-Produkten

Zur Klonierung von *blunt-end* PCR Produkten wurde das ZeroBlunt® TOPO® PCR cloning Kit (Invitrogen, Life Technologies Corp.) verwendet. *Blunt-end* PCR-Produkte wurden durch die Verwendung der Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (Thermo Scientific GmbH) generiert. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die sogenannte TOPO-Reaktion wurde wie in Tab. 3.12 dargestellt angesetzt.

**Tab. 3.12: Ansatz zur TOPO-Blunt Klonierung.**

Komponente	Vol.
PCR-Produkt	0,5 – 4 µl
pCR™-II-Blunt TOPO®	1 µl
Salzlösung	1 µl
steriles Wasser	ad 6 µl

Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei 20 °C bis 22 °C wurden 2 µl des Reaktionsansatzes zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen verwendet (Kapitel 3.1.2).

### 3.3.13 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von PCR-Produkten und linearisierter Plasmid-DNA wurde standardmäßig das kommerziell erhältliche System Wizard® SV Gel and PCR-Clean up System (Promega GmbH) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte mit einem geeigneten Volumen sterilen Wassers. Diese Methode diente als Vorbereitung zur homologen Rekombination während der Klonierung von DNA-Fragmenten.

### 3.3.14 Sequenzierung

Zur Überprüfung von Klonierungsprodukten wurde der relevante Sequenzbereich des generierten Plasmids sequenziert. Die Sequenzierung wurde mit einer Kombination aus PCR und Kettenabbruch-Methode<sup>134</sup> durchgeführt, die sich Cycle-Sequencing Methode<sup>135</sup> nennt. Hierzu wurde das BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Life Technologies Corp.) verwendet. Die Auftrennung der durch die Verwendung Fluoreszenz-markierter Dideoxynukleotide entstandenen DNA-Fragmente erfolgte kapillarelektrophoretisch mit dem

---

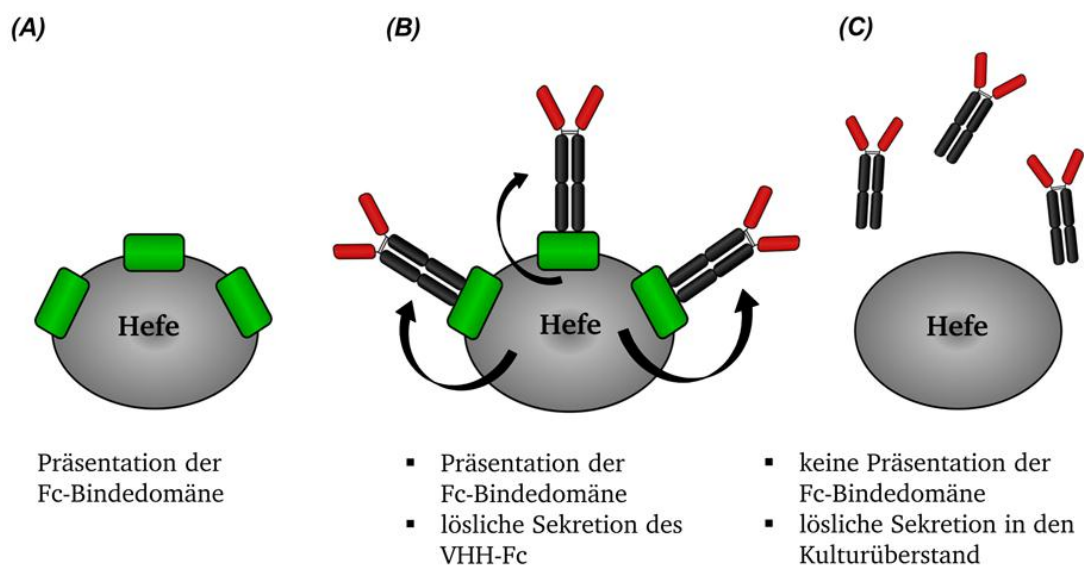
Sequenziergerät ABI prism<sup>®</sup> 3100. Die Auswertung wurde mit dem Bioinformatik-Programm *Lasergene*<sup>®</sup> (DNASTAR Inc.) durchgeführt.

Die Sequenzierung einer Klonauswahl aus den generierten VHH-Bibliotheken erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* Transformanten auf Selektivagarplatten an Eurofins MWG Operon verschickt. Die Anzucht, Plasmidisolierung und Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Die Auswertung wurde mit den von Eurofins MWG Operon zu Verfügung gestellten Daten unter Verwendung des Bioinformatik-Programms *Lasergene*<sup>®</sup> (DNASTAR Inc.) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung eines Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen

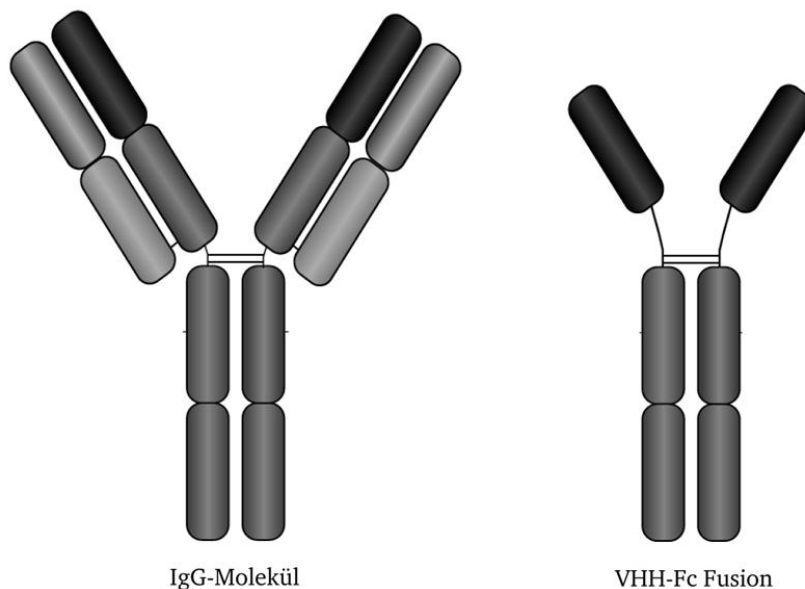
Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen und Fc-Fusionsproteinen auf Hefezellen, der damit verbundenen Selektion und der anschließenden schaltbaren Sekretion des selektierten Proteins in das Medium einer Expressionskultur zu dessen biochemischer Charakterisierung. Das Verfahren der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen wurde durch die Interaktion der auf der Zelloberfläche kovalent verankerten, von Protein A abgeleiteten Fc-Bindedomäne und der Co-Expression eines VHH-Fc Fusionsproteins oder eines IgG-Moleküls verwirklicht. Die lösliche Sekretion der VHH-Fc Fusionsproteine in den Kulturüberstand wurde durch Änderung der Expressionsbedingungen erreicht. Dadurch wurden zeitaufwändige Reformatierungsschritte des Expressionsplasmids, die z.B. bei vergleichbaren Selektionsmethoden wie der Oberflächenpräsentation auf Phagen<sup>136</sup> oder der Oberflächenpräsentation als kovalente Aga2p-Fusion<sup>92</sup> zur löslichen Produktion des selektierten Klons nötig sind, entbehrlich.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung des Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen und löslicher Produktion.**

(A) Grün dargestellt ist die auf der Zelle kovalent verankerte Fc-Bindedomäne. (B) Das löslich sekretierte VHH-Fc Fusionsprotein wird durch die Fc-Bindedomäne auf der Zelloberfläche eingefangen. (C) Durch die Reprimierung der Expression der Fc-Bindedomäne wird das VHH-Fc Fusionsprotein löslich in das Kulturmedium sekretiert und nicht mehr auf der Zelloberfläche eingefangen.

Zur Validierung des Verfahrens wurden VHH-Fc Fusionsproteine verwendet, um die Komplexität der Experimente im Vergleich zur Verwendung von vollständigen IgG-Molekülen zu reduzieren, da es sich bei der VHH-Fc Fusion um ein Protein handelt, das im Gegensatz zu einem IgG-Molekül nicht aus vier, sondern lediglich aus zwei Ketten aufgebaut ist (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Schematischer Vergleich zwischen IgG-Molekül und VHH-Fc Fusionsprotein.**

Schematischer Strukturvergleich zwischen einem vollständigen IgG-Molekül (links) und einem VHH-Fc Fusionsprotein (rechts). Bei beiden Proteinen handelt es sich um Homodimere, wobei ein IgG-Molekül aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Antikörperketten aufgebaut ist, während das VHH-Fc Fusionsprotein nur aus zwei identischen Ketten aufgebaut ist.

Im ersten Abschnitt der hier dargestellten Ergebnisse ist die Generierung eines PDI (*Protein disulfide isomerase*) überexprimierenden Hefestammes gezeigt, von welchem eine verbesserte lösliche Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen erwartet wurde und gezeigt werden konnte. Anschließend wird die Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen, die Sekretionsoptimierung und die Charakterisierung der Hefe-sekretierten VHH-Fc Fusionsproteine gezeigt, um ihre Funktionalität zu überprüfen. In den folgenden Kapiteln wird die Oberflächenpräsentation einer Fc-bindenden, von Protein A abgeleiteten Domäne auf Hefezellen sowie die Co-Expression mit löslich sekretierten VHH-Fc Fusionsproteinen und deren Oberflächenpräsentation gezeigt. In diesem Fall diente die Fc-Bindedomäne als Vermittlermolekül der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine durch die Wechselwirkung mit dem Fc-Teil. Dazu wurde das Präsentationsverhalten der Fc-Bindedomäne auf der Oberfläche von Hefezellen und deren Funktionalität im Hinblick auf die Bindung von humanen IgG-Molekülen analysiert. Um mittels Hochdurchsatz-Verfahren die

Isolierung von Klonen mit der gewünschten Eigenschaft aus generierten Variantenbibliotheken unter Verwendung des nicht-kovalenten Verfahrens zu ermöglichen, wurde die Stabilität der Genotyp-Phänotyp-Kopplung im Vorfeld mit Hilfe von Mischungsexperimenten validiert. Zur experimentellen Erprobung und zur Untersuchung der Genotyp-Phänotyp-Kopplung dieser nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen werden in einem sich anschließenden Kapitel die Ergebnisse zweier Mischungsexperimente und die Herstellung und Charakterisierung von drei generierten VHH-basierten Bibliotheken und die Durchmusterung einer dieser Bibliotheken nach VHH-Varianten mit einer neuen Eigenschaft gezeigt.

---

## 4.2 Generierung eines PDI-überexprimierenden Hefestammes

---

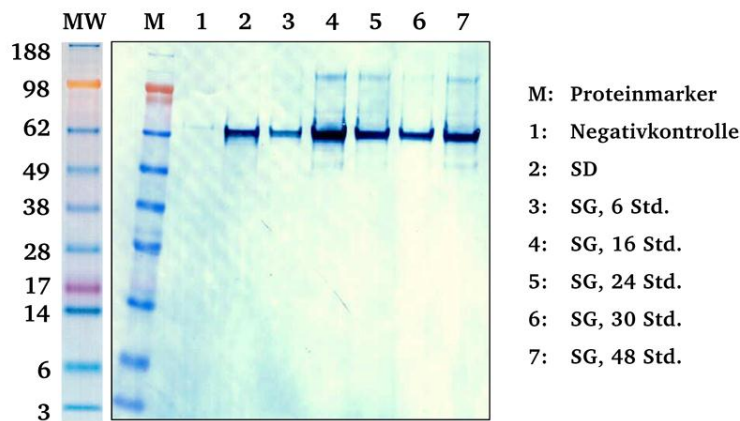
Die Oxidoreduktase PDI (*Protein disulfide isomerase*) ist ein ER-lokalisiertes Enzym, das die Oxidation und Reduktion von Disulfidbrücken in Substratproteinen katalysiert<sup>137</sup>. Es wurde in einer bereits veröffentlichten Studie gezeigt, dass die Überexpression dieses Enzyms zu einer gesteigerten Sekretion von scFv-Fragmenten aus der Hefe führt<sup>118</sup>. Rakestraw und Mitarbeiter zeigten 2009, dass die Überexpression von PDI zu einer signifikanten Erhöhung der sekretierten IgG-Menge aus Hefezellen führte und dass die Integration einer PDI-Expressionskassette ins Hefegenom einer episomalen Expression der PDI zur Steigerung der Sekretion von heterologen Proteinen vorzuziehen ist<sup>111</sup>.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Generierung des *S. cerevisiae* Stammes APO-E dargestellt. Im Vorfeld wurde vermutet, dass die PDI-Überexpression die Sekretionsleistung des Hefestammes für VHH-Fc Fusionsproteine erhöht. Dieser Hefestamm wurde durch die chromosomale Integration einer PDI-Expressionskassette in das Genom von EBY100 generiert. Die Herstellung des *S. cerevisiae* Stammes APO-B erfolgte in vergleichbarer Weise (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall wurde die PDI-Expressionskassette in gleicher Weise chromosomal in den Stamm BJ5464 integriert.

Zur Amplifizierung der Hefe-eigenen Oxidoreduktase PDI wurde chromosomale DNA aus einer stationär wachsenden EBY100 Kultur extrahiert (Kapitel 3.1.11). Mittels *Gap-Repair* PCR (Kapitel 3.3.3) und unter Verwendung der Oligodesoxyribonukleotide *PDI-GR-up* und *PDI-GR-rp* wurde im Anschluss die Sequenz der PDI mit homologen Bereichen zum Zielvektor *pESC-URA* amplifiziert. Als Matrize für die PCR diente 1  $\mu$ l der chromosomalen DNA-Präparation. Die Gensequenz wurde anschließend mittels homologer Rekombination in den Zielvektor kloniert (Kapitel 3.1.12). Zur Initiierung der homologen Rekombination wurde der



Zielvektor zuvor mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* linearisiert (Kapitel 3.3.6). Elektrokompente EBY100 *URA<sup>-</sup>* Zellen wurden mit dem Zielvektor und dem PCR-Produkt der PDI-Gensequenz transformiert (Kapitel 3.1.8.1). Der Hefestamm EBY100 *URA<sup>-</sup>* wurde freundlicherweise von Stefan Zielonka (Biochemie, TU Darmstadt, AK Prof. Kolmar) zu Verfügung gestellt. Bei diesem Stamm wurde zuvor der Auxotrophiemarker *URA3* durch 5-Fluororotsäure Selektion<sup>138</sup> mutiert. Nach Überprüfung der Klonierung mittels Sequenzierung (Kapitel 3.3.14) wurde in einem zweiten Klonierungsschritt der induzierbare Promotor Gal1/10 des generierten Vektors *pESC-URA-PDI* gegen den konstitutiv exprimierenden Promotor GAPDH substituiert, um den Vektor *pESC-pGAPDH-PDI* herzustellen. Zu diesem Zweck wurde die DNA-Sequenz des GAPDH-Promotors aus dem Plasmid *pGAPZA* (Life Technologies Corp.) unter Verwendung der Oligodesoxyribonukleotide *GAPDH-up* und *GAPDH-rp* amplifiziert (Kapitel 3.3.3) und der Vektor *pESC-URA-PDI* unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *BstAPI* linearisiert (Kapitel 3.3.6) und gereinigt (Kapitel 3.3.13). Im Anschluss erfolgte die Transformation von elektrokompenten EBY100 *URA<sup>-</sup>* Zellen (Kapitel 3.1.8.1) mit dem linearisierten Zielvektor und dem GAPDH-PCR-Produkt zur Klonierung mittels homologer Rekombination in Hefezellen (Kapitel 3.1.12). Nach erfolgter Selektion und erneuter Sequenzierung (Kapitel 3.3.14) wurden elektrokompente EBY100 *URA<sup>-</sup>* Zellen mit dem Plasmid *pESC-URA-pGAPDH-PDI* transformiert. Die generierten Vektoren *pESC-URA-PDI* und *pESC-URA-pGAPDH-PDI* sind in Kapitel 2.5 schematisch dargestellt. Die episomale Expression der PDI wurde im Anschluss mittels Western-Blot Analyse (Kapitel 3.2.11) überprüft (Abb. 4.2). Zu diesem Zweck wurde eine 50 ml Kultur in geeignetem Glukose-haltigen SD-Medium angezogen. Die initiale Zelldichte betrug  $3 \times 10^6$  Zellen/ml. Ausgehend von dieser Kultur wurde anschließend eine weitere Kultur (50 ml) in Galaktose-haltigem Medium hergestellt, um die Genexpression zusätzlich in Galaktose-haltigem Medium zu überprüfen. Beide Kulturen wurden bis zu einer Zelldichte von  $3 \times 10^7$  Zellen/ml bei 30 °C kultiviert und im Anschluss zu definierten Zeitpunkten  $2 \times 10^7$  Zellen entnommen und für die Analyse mittels Western-Blot aufgearbeitet (Kapitel 3.2.7). Die Darstellung der Western-Blot Analyse ist in Abb. 4.3 gezeigt und repräsentiert den intrazellulären Anteil der Oxidoreduktase PDI. Der spezifische Nachweis erfolgte mit einem PDI-spezifischen Antikörper aus der Maus. Die Detektion auf der PVDF-Membran erfolgte im Anschluss mit einem Maus-spezifischen Antikörper (POD-Konjugat) aus der Ziege.



**Abb. 4.3: Western-Blot Analyse der episomalen PDI Expression in Hefezellen.**

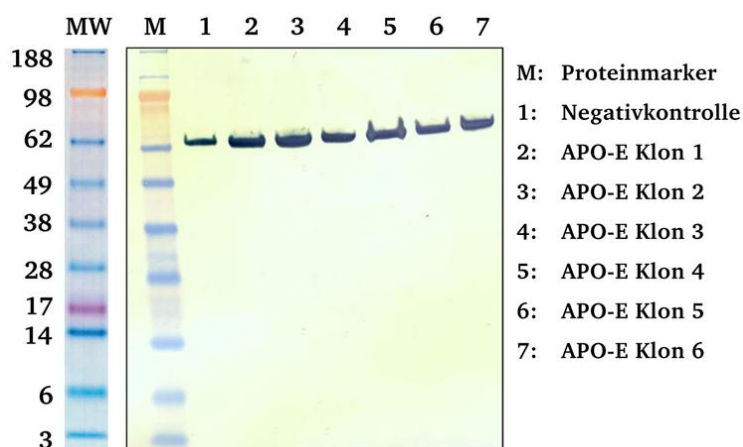
Western-Blot Analyse von  $2 \times 10^7$  EBY100  $URA^-$  Zellen (*pESC-URA-pGAPDH-PDI* Transformanten). Die Detektion erfolgte über eine PDI-spezifischen Primärantikörper aus der Maus und einen Maus-spezifischen Sekundärantikörper aus der Ziege (POD-Konjugat). Spur 1 zeigt den intrazellulären PDI-Anteil in EBY100  $URA^-$  (Negativkontrolle). Spuren 2 bis 7 zeigen den intrazellulären PDI-Anteil durch zusätzliche Überexpression der episomal kodierten PDI-Sequenz reguliert durch den GAPDH-Promotor zu verschiedenen Zeitpunkten (s. Legende).

Die in Abb. 4.3 gezeigte Western-Blot Analyse verdeutlichte, dass die episomal kodierte PDI sowohl in Glukose- (Abb. 4.3 Spur 2) als auch in Galaktose-haltigem Medium (Abb. 4.3 Spur 3 bis 7) exprimiert wurde und über den PDI-spezifischen Nachweisantikörper im Zelllysats detektiert werden konnte. Dieser Befund ist auf die Regulation der PDI-Expression durch den konstitutiv-exprimierenden GAPDH-Promotor zurückzuführen. Im Vergleich mit der Negativkontrolle (EBY100  $URA^-$  Zellen, Abb. 4.3 Spur 1) war ein signifikant stärkeres Signal im Western-Blot zu verzeichnen.

Im nächsten Schritt ist die Generierung des PDI-überexprimierenden Stammes APO-E gezeigt. Zur Herstellung von APO-E wurde die PDI-Expressionskassette, bestehend aus der Sequenz für den GAPDH-Promotor und der Sequenz für die PDI, in das Hefegenom von EBY100 integriert. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz der PDI-Expressionskassette in den Integrationsvektor *pRS306* (ATCC) kloniert. Dazu wurden die Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *XbaI* mittels PCR (Kapitel 3.3.2) an die Expressionskassette angefügt. Es wurden die Oligodesoxyribonukleotiden *XbaI-PDI-up* und *XhoI-PDI-rp* verwendet. Im Anschluss an die Reinigung des PCR-Produkts (Kapitel 3.3.13) erfolgte die endonukleolytische Restriktion (Kapitel 3.3.6) des PCR-Produkts und des Zielvektors *pRS306*. Es folgte die Ligation des Zielvektors *pRS306* mit der geschnittenen Expressionskassette (pGAPDH-PDI) unter Verwendung der T4-DNA Ligase (Kapitel 3.3.10) und die Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen (Kapitel 3.1.2). Durch die Anzucht von fünf Klonen (Kapitel

3.1.1), deren Plasmidisolierung (Kapitel 3.1.3) und Sequenzierung (Kapitel 3.3.14) konnte ein Klon mit der korrekten Sequenz (*pRS306-PDI*) identifiziert werden. Dieser wurde für die Integration der PDI-Expressionskassette in das Genom von EBY100 genutzt.

Zur Vorbereitung der chromosomalen Integration wurde eine präparative Plasmidisolierung des Vektors *pRS306-PDI* wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Linearisierung des Plasmids unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *BstBI* (Kapitel 3.3.6). 2,5 µg des linearisierten Vektors wurden anschließend zur Transformation von EBY100 *URA<sup>-</sup>* Zellen verwendet (Kapitel 3.1.8.1) und dadurch die spezifische Integration der PDI-Expressionskassette in das Hefegenom ermöglicht. Nach erfolgter Selektion auf SD-URA Agarplatten wurde die chromosomale Integration des Vektors *pRS306-PDI* mittels Western-Blot Analyse (Kapitel 3.2.11) experimentell untersucht. Zu diesem Zweck wurden sechs Klone in YPD-Medium kultiviert (Kapitel 3.1.4) und anschließend in geeignetes Galaktose-haltiges SD-Medium überführt. Nach vier Tagen wurden jeweils  $2 \times 10^7$  Zellen entnommen und unter den üblichen Bedingungen für die Analyse der PDI-Expression mittels Western-Blot vorbereitet (Kapitel 3.2.9/3.2.11). Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.4 dargestellt.



**Abb. 4.4: Western-Blot Analyse der chromosomalen PDI-Expression in Hefezellen.**

Western-Blot Analyse unter reduzierenden Bedingungen von Zelllysaten ( $2 \times 10^7$  Zellen) von EBY100 (Spur 1) und APO-E (Spur 2-4) Kulturen die vier Tage in Galaktose-haltigem SD-Medium kultiviert wurden. Die Detektion erfolgte über einen PDI-spezifischen Primärantikörper aus der Maus und einen Maus-spezifischen Sekundärantikörper aus der Ziege (POD-Konjugat).

Durch die spezifische Detektion der Oxidoreduktase PDI in den Zelllysaten der sechs Hefekulturen (Abb. 4.4) konnte die erfolgreiche Überexpression der PDI festgestellt werden (Abb. 4.4 Spur 2-4). Im Vergleich zu den APO-E Klonen zeigte die Probe des EBY100 Stamms

ein signifikant schwächeres Signal im Western-Blot (Abb. 4.4 Spur 1). Dieser Befund deutete auf die erfolgreiche Integration des Vektors *pRS306-PDI* in das Genom des Stammes EBY100 *URA<sup>-</sup>* hin und zeigte, dass die Oxidoreduktase PDI in diesem Stamm stärker exprimiert wurde als im Stamm EBY100. Zur stabilen chromosomalen Integration der PDI-Expressionskassette wurde abschließend der zur Selektion verwendete URA3 Marker mittels 5-Fluororotsäure mutiert (Kapitel 3.1.5). Im folgenden Kapitel ist die direkte Anwendbarkeit des Stammes APO-E in Bezug auf die Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins gezeigt.

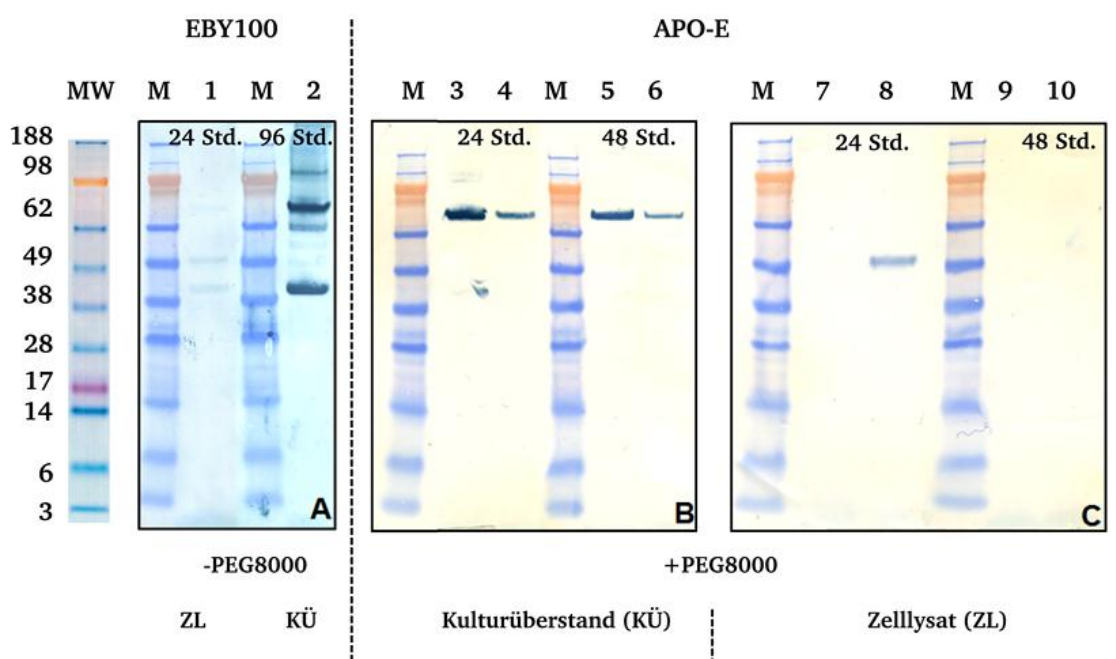
---

### 4.3 Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen

---

Im diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der löslichen Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen aus Hefezellen dargestellt um die Sekretionsleistung der *S. cerevisiae* Stämme EBY100 und APO-E für VHH-Fc Fusionsproteine zu überprüfen. Da es sich bei dem VHH um eine einkettige Domäne handelt, wurde somit die Komplexität des Versuchsansatzes im Vergleich zur Verwendung von vollständigen, mehrkettigen IgG-Molekülen reduziert. Untersucht wurde neben der Sekretionsleistung der einzelnen Stämme auch der Einfluss der Gendosis auf die sekretierte Proteinmenge. Zu diesem Zweck wurden Expressionsplasmide mit unterschiedlichen Replikationsursprüngen (Ori) verwendet, die zuvor über homologe Rekombination in Hefezellen generiert wurden. Zu diesem Zweck wurde die DNA-Sequenz des VHH-Fc Konstrukts mit spezifischen Oligodesoxyribonukleotiden aus dem Plasmid *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* amplifiziert und in den linearisierten Vektor *pESC-Leu* kloniert. Dadurch wurde der Vektor *pESC-pGal1-app8-VHH1-Fc* mit dem Ori 2-micron generiert. Ein Plasmid mit dem Ori CEN6/ARS4 zeichnet sich durch eine geringe, ein Plasmid mit dem Ori 2-micron durch eine hohe Kopienzahl innerhalb einer Zelle aus<sup>139</sup>. Zu Beginn wurden elektrokompente APO-E und EBY100 Zellen mit den Plasmiden *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* und *pESC-pGal1-app8-VHH1-Fc* für die lösliche Sekretion des hsEGFR-spezifischen VHH-Fc Fusionsproteins transformiert (Kapitel 3.1.8.1). Beide Plasmide kodierten neben der VHH-Gensequenz auch für das Signalpeptid app8 zur löslichen Sekretion. Für die Expression wurden geeignete Galaktose-haltige SD-Medien mit 11% (w/v) PEG8000 Zusatz und ohne PEG8000 Zusatz verwendet, um zusätzlich den Einfluss von PEG8000 auf die sekretierte Menge des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand zu ermitteln. Im Vorfeld wurde vermutet, dass sich der Zusatz von PEG8000 vorteilhaft auf die Sekretion von heterologen Proteinen auswirken kann, da bereits in der Literatur darauf hingewiesen wurde, dass PEG einen positiven Einfluss auf die Sekretion heterologer Proteine haben kann<sup>140</sup>. Zu gegebenen

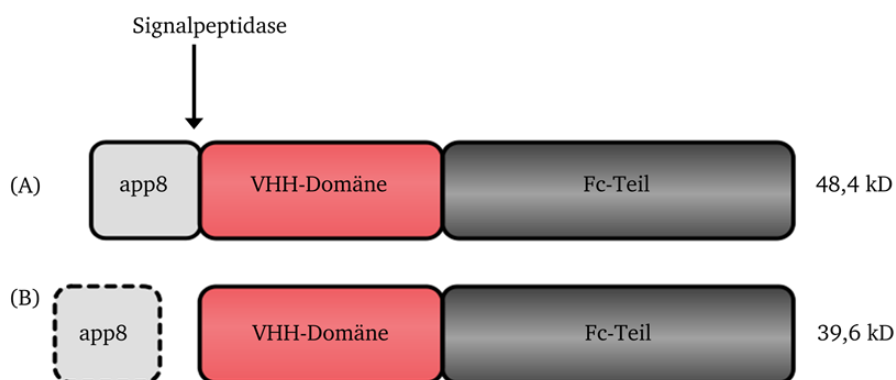
Zeitpunkten (24, 48, 96 Std.) wurden Proben des Kulturüberstandes entnommen und die im Überstand enthaltenen Proteine mittels Trichloressigsäure präzipitiert (Kapitel 3.2.6). Die Probenaufarbeitung der Zelllysate erfolgte entsprechend Kapitel 3.2.7. Die Markierung der VHH-Fc Fusionsproteine erfolgte auf der PVDF-Membran über einen Fc-spezifischen Primärantikörper aus dem Kaninchen und einen POD-konjugierten Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörper aus der Ziege. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.5 dargestellt. In beiden Konstrukten wurde zuvor die Glykosylierungsstelle im Fc-Teil an Position 297 mittels ortsspezifischer Mutagenese mutiert um die aus Hefe bekannte Hypermannosylierung während der N-Glykosylierung zu verhindern. Zu diesem Zweck wurde die Mutagenese dieser Position mittels PCR (Kapitel 3.3.5.1) und unter Verwendung des Oligodesoxyribonukleotids *N-Q-HC-mut* durchgeführt. Hiervon wurde sich eine erleichterte und verbesserte Sekretion des Proteins durch die Hefe erhofft.



**Abb. 4.5: Analyse der löslichen VHH-Fc Sekretion.**

Western-Blot Analyse von Kulturüberständen und Zelllysaten aus EBY100 und APO-E Kulturen mit unterschiedlichen Expressionsbedingungen. **(A)** Analyse von Zelllysate ( $1 \times 10^7$  Zellen, Spur 1) und Kulturüberstand ( $5 \times 10^7$  Zellen, Spur 2) einer VHH-Fc (CEN6/ARS4) Expression nach 96 Stunden ohne PEG8000 Zusatz. **(B)** Analyse von Kulturüberständen von VHH-Fc Expressionen mit PEG8000 Zusatz nach 24 Stunden und 48 Stunden. Als Expressionplasmid wurde ein ARS4/CEN6 Plasmid (Spur 3) und ein 2-micron Plasmid (Spur 4 und 6) verwendet. **(C)** zeigt die zu **(B)** korrelierenden Zelllysate. Die Detektion erfolgte über einen Fc-spezifischen Primärantikörper (Kaninchen) und einen POD-konjugierten Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörper (Ziege). ZL: Zelllysate, KÜ: Kulturüberstand.

Abb. 4.5 A zeigt die erfolgreiche Expression des VHH-Fc Konstrukts und dessen löslicher Sekretion durch Kultivierung von EBY100 Transformanten ohne PEG8000-Zusatz. Die Proteine wurden im Zelllysats (Spur 1) nach 24 Stunden und im Kulturüberstand (Spur 2) nach 96 Stunden spezifisch nachgewiesen. Das analysierte Volumen des Überstandes (Spur 2) entsprach dem äquivalenten Volumen von  $5 \times 10^7$  Zellen. In diesem wurde das VHH-Fc Protein in monomerer ( $\sim 40$  kD) und auch in dimerisierter Form ( $\sim 90$  kD) erst nach einer Expressionsdauer von 96 Std. vorgefunden (nicht-reduziert). Im Zelllysats wurden ebenfalls zwei VHH-Fc-spezifische Banden detektiert (Abb. 4.5 Spur 1). Die Bande mit dem kleineren Molekulargewicht konnte dem monomeren VHH-Fc Protein ( $\sim 40$  kD) zugeordnet werden, da sie eine Größe zwischen 38 kD und 49 kD aufwies. Mit Hilfe des Sequenzanalyse-Programms *Lasergene*<sup>®</sup> (DNASTAR Inc.) wurde im Vorfeld ein Molekulargewicht von 39,6 kD für das monomere VHH-Fc Fusionsprotein ermittelt. Die zweite Bande wies ein leicht höheres Molekulargewicht auf (Abb. 4.5 Spur 1). Diese größere Proteinform war im Falle der nicht erfolgten Prozessierung des VHH-Fc Fusionsproteins zu erwarten, da das Signalpeptid app8 eine Größe von 8,7 kD aufweist und im Falle der Nicht-Prozessierung durch die zelluläre Signalpeptidase die Molekülgröße des VHH-Fc Fusionsproteins im Western-Blot sichtbar erhöht. In der nachfolgenden Abb. 4.6 ist die schematische Darstellung der nicht-prozessierten (Abb. 4.6 A) und der prozessierten (Abb. 4.6 B) Form des Proteins gezeigt.



**Abb. 4.6: Prozessierung des VHH-Fc Fusionsproteins.**

Schematische Darstellung der intrazellulären Zustandsformen des VHH-Fc Fusionsproteins. Das nicht prozessierte Protein (**A**) liegt intrazellulär als größere Form (48,4 kD) vor, da das Signalpeptid app8 (8,7 kD) nicht abgespalten wurde, während das reife Protein (**B**) ein Molekulargewicht von 39,6 kD aufwies. Der Pfeil markiert die Erkennungsstelle der intrazellulären Signalpeptidase.

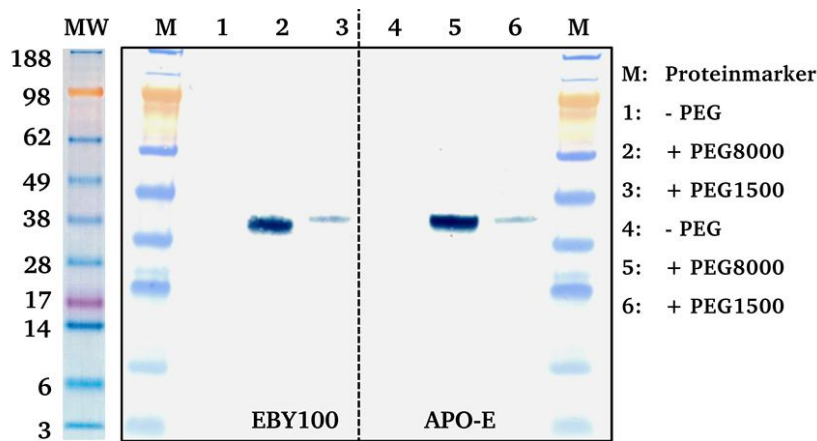
In Abb. 4.5 B (S. 71) sind die Ergebnisse der Western-Blot Analyse der Kulturüberstände nach 24 und 48 Stunden von APO-E Transformanten gezeigt. Bei den aufgetragenen Kulturvolumina handelte es sich um Volumina, die äquivalent zu  $1 \times 10^7$  Zellen waren. In diesem Fall wurde der Überstand einer fünf-fach geringeren Zellmenge im Vergleich zu Abb.



4.5 A Spur 2 analysiert. Abb. 4.5 B zeigt zusätzlich den Vergleich zwischen der Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand von einem CEN6/ARS4-Plasmid (Spur 3 und 5) und von einem 2-micron Plasmid (Spur 4 und 6). Die Genexpression von beiden Plasmiden wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt. Im Unterschied zu Abb. 4.5 A erfolgte die Kultivierung der Zellen während der Genexpression in Gegenwart von 11% (w/v) PEG8000. In Abb. 4.5 C sind die zu B korrelierenden Zelllysate mittels Western-Blot analysiert worden.

Wie zu erkennen ist, konnte sowohl das CEN6/ARS4-Plasmid kodierte (Abb. 4.5 B, Spur 3) als auch das 2-micron Plasmid kodierte VHH-Fc Fusionsprotein (Abb. 4.4 B, Spur 4) erfolgreich im Kulturüberstand detektiert werden. Bereits nach 24 Stunden war, anders als bei der Kultivierung ohne PEG8000 (Daten nicht gezeigt), ein deutliches Signal erkennbar. Das deutete auf eine stärkere Sekretion des Proteins in Gegenwart von PEG8000 hin. Zusätzlich zeigte sich bei der Kultur mit dem 2-micron Plasmid eine deutlich geringere Proteinmenge in einem äquivalenten Kulturvolumen, da schwächere Bandensignale detektiert wurden (vgl. Abb. 4.5 B Spur 3 und 5 mit Spur 4 und 6). Bei der Analyse der Zelllysate (Abb. 4.5 C) wurde deutlich, dass lediglich im Zelllysate der 2-micron Kultur (Spur 8) ein VHH-Fc spezifisches Signal detektiert werden konnte. Dieser Befund deutete trotz der höheren Gendosis auf eine weniger effiziente Sekretion des Proteins unter Verwendung eines 2-micron Plasmids hin als bei der Verwendung eines CEN6/ARS4-Plasmid. Das Bandensignal wies ein Molekulargewicht auf, das der Größe der nicht-prozessierten Form (Abb. 4.6 A) entsprach. Die untersuchte Probe des Zelllysats aus der CEN6/ARS4-Kultur zeigte weder bei 24 Stunden noch bei 48 Stunden ein VHH-Fc spezifisches Signal. Intrazellulär konnte das VHH-Fc Protein hier nicht mehr nachgewiesen werden, was auf eine effektive Sekretion des Proteins hindeutet. Es ließ sich feststellen, dass die Expression und lösliche Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen in Gegenwart von 11% (w/v) PEG8000 deutlich höhere Proteinausbeuten lieferte als die in PEG-freiem Medium. Ebenfalls konnte unter Verwendung eines CEN6/ARS4-Plasmids eine signifikant größere Proteinmenge sekretiert und detektiert werden als bei Verwendung des 2-micron Plasmids. Bei der Expression ohne PEG8000 ließen sich intrazellulär zwei verschieden große Formen des Proteins detektieren; eine größere nicht-prozessierte und eine kleinere prozessierte Form. Bei Analyse des Zelllysats aus der PEG8000-haltigen Expressionskultur mit dem CEN6/ARS4-Plasmid ließ sich keine der beiden intrazellulären Proteinformen detektieren, während im Zelllysate der PEG8000-haltigen Expressionskultur mit dem 2-micron-Plasmid das Auftreten der nicht-prozessierten Proteinform beobachtet wurde. Zur weiteren Analyse des Einflusses von Polyethylenglykol (speziell PEG8000) auf die lösliche

Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen wurden ausgehend von *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* APO-E und EBY100 Transformanten jeweils drei unterschiedliche Expressionskulturen hergestellt, die sich ausschließlich in ihrem PEG-Gehalt unterschieden (ohne PEG, 11% (w/v) PEG8000 und 11% (w/v) PEG1500). Es galt experimentell zu untersuchen, ob das Molekulargewicht des verwendeten PEGs Einfluss auf die sekretierte Proteinnmenge hatte. Nach Abschluss der Expression in Galaktose-haltigem SD-Medium wurde ein Kulturvolumen entsprechend  $1 \times 10^7$  Zellen entnommen und nach Zentrifugation der zellfreie Überstand wie in den Kapiteln 3.2.9 und 3.2.11 erläutert für die Western-Blot Analyse vorbereitet. Dies erfolgte unter reduzierenden Bedingungen. Die Detektion von VHH-Fc Proteinen auf der Membran erfolgte wie zuvor beschrieben über einen Fc-spezifischen Nachweisantikörper. Das Ergebnis der Western-Blot Analyse ist in Abb. 4.7 dargestellt.



**Abb. 4.7: Einfluss von Polyethylenglykol auf die Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen.**

VHH-Fc Sekretion nach 48 Stunden. Western-Blot Analyse von EBY100 und APO-E Kulturüberständen zur Analyse des Einflusses von Polyethylenglykol (PEG) auf die im Kulturüberstand detektierbaren Proteinmengen. Expressionsmedien mit unterschiedlicher Zusammensetzung. Spur 1 und 4: kein PEG-Zusatz, Spur 2 und 5: 11% (w/v) PEG8000, Spur 3 und 6: 11% (w/v) PEG1500.

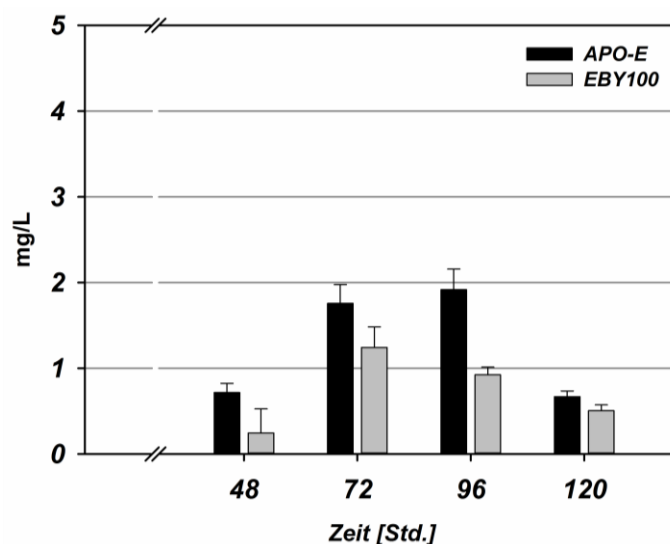
Abb. 4.7 verdeutlicht, dass der Zusatz von Polyethylenglykol entscheidend für eine erfolgreiche Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand war. Dies galt sowohl für EBY100 als auch für APO-E Expressionskulturen. Ohne Zusatz von PEG konnte bei beiden Stämmen kein Protein im Kulturüberstand detektiert werden (Spur 1 und 4). Die erfolgreiche Sekretion des Proteins im analysierten Volumen des Kulturüberstands war in diesem Experiment innerhalb von 48 Stunden nur in Gegenwart von PEG8000 oder PEG1500 möglich. Ferner hatte das Molekulargewicht des verwendeten PEGs einen signifikanten Einfluss auf die im Überstand lokalisierten Proteinmengen. Weniger entscheidend war hingegen die Verwendung eines PDI-überexprimierenden Hefestammes. Die Ergebnisse aus Abb. 4.7 ließen den Schluss zu, dass hochmolekulares PEG8000 besser für die lösliche



Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand geeignet war, als der Zusatz von PEG mit einem Molekulargewicht von 1500 Da. Für die Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen wurde auf Grund der oben beschriebenen Ergebnisse in allen weiteren Experimenten der Zusatz von PEG8000 zum Kulturmedium verwendet. Eine genauere Quantifizierung der sekretierten Proteinmenge aus APO-E und EBY100 Expressionskulturen und dementsprechend der Einfluss der PDI-Überexpression auf die lösliche Proteinausbeute im Kulturüberstand ist im nachfolgenden Kapitel dargestellt.

#### 4.4 Quantifizierung von VHH-Fc Proteinen in Kulturüberständen

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen die experimentelle Analyse der Sekretionsleistung der Hefestämme APO-E und EBY100. Wie bereits erwähnt, wurde vermutet, dass die Überexpression der Oxidoreduktase PDI einen positiven Einfluss auf die lösliche Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen hat. Zu diesem Zweck wurden elektrokompente EBY100 und APO-E Zellen mit dem Plasmid *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* transformiert (Kapitel 3.1.8.1) und auf Selektivagarplatten selektiert. Es wurden 50 ml Expressionskulturen in Galaktose-haltigem Medium +PEG8000 hergestellt. Die initiale Zelldichte betrug  $1 \times 10^7$  Zellen/ml. Über einen Zeitraum von 120 Stunden wurden die Proteinkonzentrationen im Kulturüberstand bestimmt. Die Analyse des Überstandes erfolgte mittels Biolayer-Interferometrie unter Verwendung von Protein A-Biosensoren wie in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Die über diesen Zeitraum ermittelten Konzentrationen sind in Abb. 4.8 graphisch dargestellt. Als Negativkontrolle wurde Galaktose-haltiges SD-Medium +PEG8000 mit 2% BSA versetzt, als Positivkontrolle wurde ein VHH-Fc Fusionsprotein bekannter Konzentration einer HEK293-Expression verwendet. Zur Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde im Vorfeld eine Kalibrierreihe mit diesem Protein erstellt.

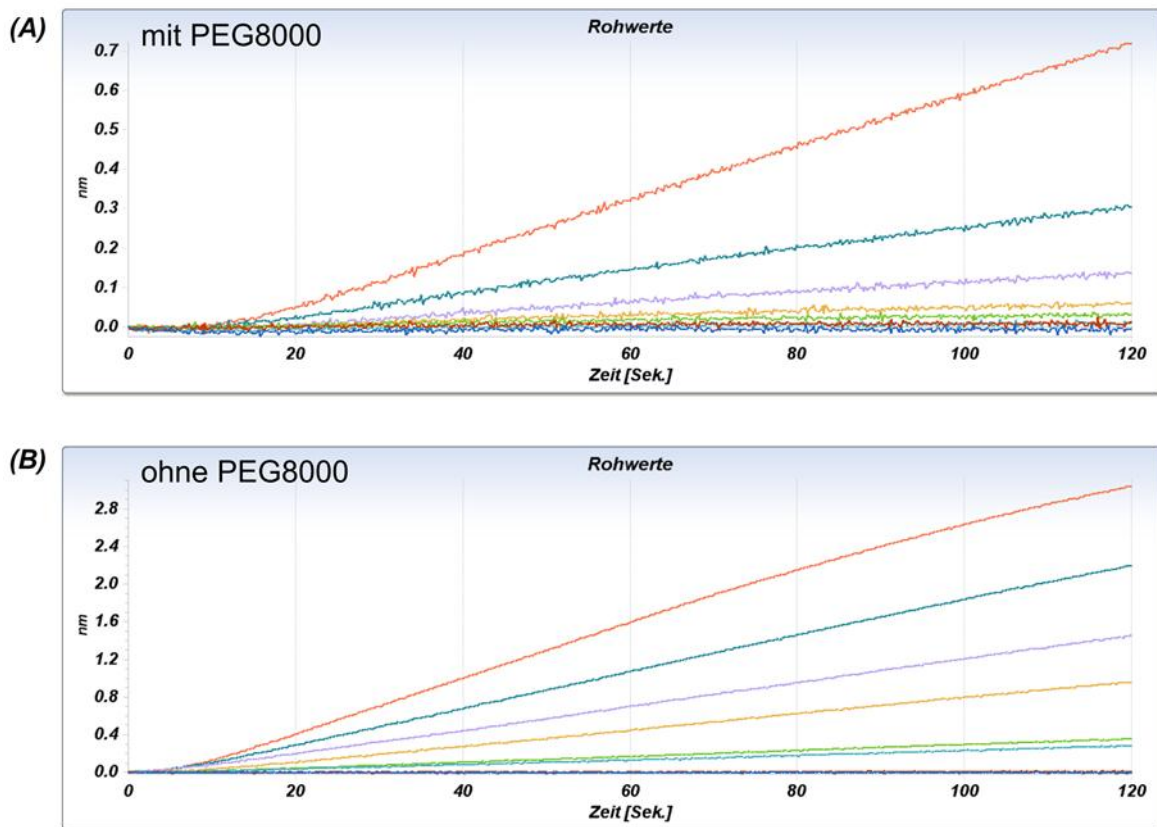


**Abb. 4.8: VHH-Fc Sekretionsausbeuten aus APO-E und EBY100 Expressionskulturen.**

Biolayer-Interferometrie Messung zur Bestimmung der Konzentration des VHH-Fc Fusionsproteins im Überstand von EBY100 und APO-E Expressionskulturen über einen Zeitraum von 120 Stunden. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Messungen.

Das VHH-Fc Fusionsprotein konnte in beiden Kulturen über einen Zeitraum von 120 Stunden detektiert werden (Abb. 4.8). Tendenziell war zu beobachten, dass im Überstand der APO-E Expressionskultur über die Zeit eine höhere Proteinkonzentration gemessen wurde, als im Überstand der EBY100 Kultur. Die größte Proteinkonzentration wurde nach 96 Stunden in der APO-E Kultur ( $1,9 \pm 0,2$  mg/L) gemessen. Bis zu diesem Zeitpunkt stieg die Proteinkonzentration kontinuierlich an und fiel danach auf  $0,7 \pm 0,1$  mg/L (120 Std.) ab. In der EBY100-Expressionskultur wurden im Vergleich zur APO-E Expressionskultur, über die Zeit deutlich niedrigere Messwerte erzielt. Hier konnte die höchste Proteinkonzentration zwar bereits nach 72 Stunden, aber mit einem deutlich niedrigeren Wert ( $1,2 \pm 0,2$  mg/L) im Vergleich zu APO-E bestimmt werden. Diese lag dennoch unter der Proteinkonzentration der APO-E Kultur bei 72 Stunden (vgl.  $1,8 \pm 0,2$  mg/L). Bereits nach 72 Stunden begann die Proteinkonzentration wieder abzusinken. Nach 120 Stunden wurde eine Konzentration von  $0,5 \pm 0,1$  mg/L gemessen. Ein Vergleich der Proteinkonzentration der EBY100 mit der der APO-E Expressionskultur nach 96 Stunden macht deutlich, dass die VHH-Fc Proteinkonzentration im Überstand der APO-E Expressionskultur nahezu doppelt so hoch war als die VHH-Fc Konzentration im Überstand der EBY100 Expressionskultur. Des Weiteren war zu beobachten, dass die Proteinkonzentration im EBY100-Überstand nach einer Kultivierungsdauer von 72 Stunden den Maximalwert erreicht hatte.

Als Kontrolle für die Quantifizierung der VHH-Fc Proteinkonzentrationen in Überständen von Hefekulturen wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Es sollte verifiziert werden, ob es sich bei den mittels Biolayer-Interferometrie (Octet RED) detektierten Signalen aus Abb. 4.8 um VHH-Fc-spezifische Signale handelte, da während der Analyse der Rohwerte beobachtet wurde, dass sich PEG8000 störend auf die Messung auswirkte. In Abb. 4.9 sind beispielhaft zwei Messprofile zur Quantifizierung von IgG-Molekülen in Gegenwart von PEG8000 und ohne PEG8000 gezeigt. Auffällig waren die in Gegenwart von PEG8000 niedrigeren erreichten Schichtdicken der Beladung der Protein A-Biosensoren (Abb. 4.9 A) im Gegensatz zur Verwendung von IgG-Molekülen, die zur Beladung in PBS vorlagen (Abb. 4.9 B). Zusätzlich war in Gegenwart von PEG8000 ein deutliches Rauschen der Messwerte und ein verzögerter Anstieg der Signale zu beobachten.



**Abb. 4.9: Exemplarische Biolayer-Interferometrie-Messprofile mit und ohne PEG-Zusatz.**

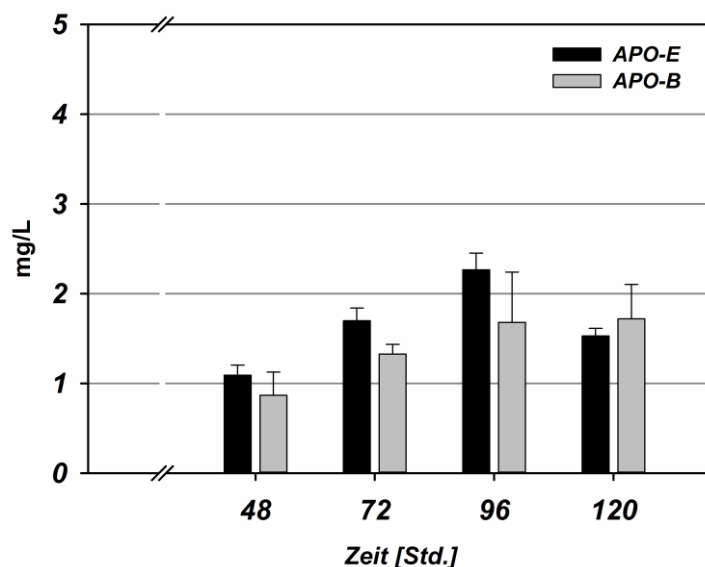
Exemplarische Biolayer-Interferometrie Messprofile der Beladung von Protein A Biosensoren mit IgG-Molekülen unter Verwendung von löslichem Protein in SD-Medium + 11% (w/v) PEG8000 **(A)** und in PBS (ohne PEG8000) **(B)**. Die bunten Kurven repräsentieren verschiedene zur Beladung der Protein A-Biosensoren verwendete IgG-Konzentrationen. In absteigender Reihenfolge 25, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0 mg/L.

Abb. 4.9 verdeutlicht den Einfluss von PEG8000 auf die Biolayer-Interferometrie Messung. Durch den Zusatz von PEG8000 war die Viskosität des Mediums stark erhöht. Es waren deutliche Interferenzen während der Beladung der Biosensoren mit dem IgG-Molekül zu beobachten, was sich durch den verzögerten und ungleichmäßigen Anstieg der Sensorsignale in Abb. 4.9 A gegenüber Abb. 4.9 B zeigt.

Zum Zweck der Überprüfung der Biolayer-Interferometrie Messwerte wurden drei unabhängige Expressionskulturen mit einem Volumen von 20 ml hergestellt (Kapitel 3.1.13) und die Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen mittels Biolayer-Interferometrie bestimmt (Abb. 4.10). Zur Überprüfung der Spezifität der Signale wurde basierend auf diesen Werten ein Kulturvolumen errechnet, welches einer definierten VHH-Fc Proteinkonzentration entsprach. Dieses Kulturvolumen wurde anschließend, nach TCA-Präzipitation der Proteine im

Überstand (Kapitel 3.2.6) im Western-Blot über den spezifischen Nachweis mit einem Fc-spezifischen Antikörper untersucht (Kapitel 3.2.11).

Für die Biolayer-Interferometrie Messung erfolgte die Kultivierung erneut für 120 Stunden. Die Zelldichte zu Beginn des Experimentes betrug  $5 \times 10^6$  Zellen/ml. Diesmal wurden die beiden PDI-überexprimierenden *S. cerevisiae* Stämme APO-E und APO-B zur löslichen Sekretion der VHH-Fc Proteinen verwendet und die Proteinkonzentrationen in den Kulturüberständen zu gegebenen Zeitpunkten mittels Biolayer-Interferometrie (Kapitel 3.2.8) bestimmt. Durch den Vergleich mit einer zuvor erstellten Kalibrierreihe wurden die Proteinkonzentrationen aus den Rohwerten errechnet. Die Messungen wurden nach 48, 72, 96 und 120 Stunden durchgeführt. Die ermittelten Konzentrationen sind graphisch in Abb. 4.10 dargestellt

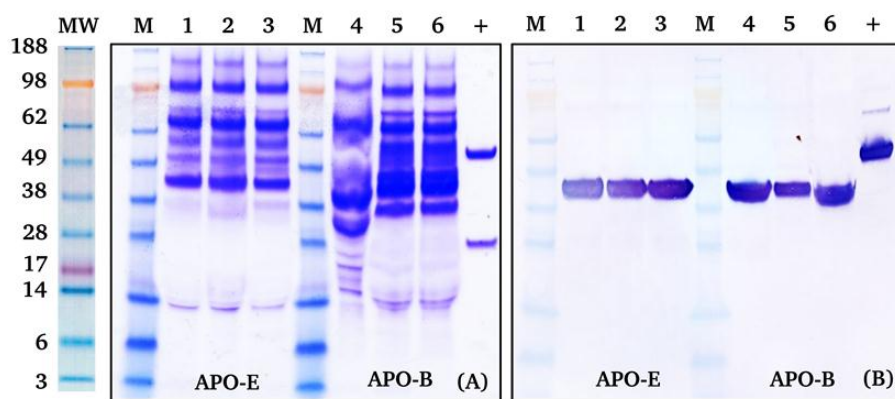


**Abb. 4.10: VHH-Fc Sekretionsausbeuten aus APO-E und APO-B Expressionskulturen.**

Biolayer-interferometrische Bestimmung der Konzentration des VHH-Fc Fusionsproteins im Überstand von APO-E und APO-B Expressionskulturen über einen Zeitraum von 120 Stunden mittels Protein A-Biosensoren. Die Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Klone.

Abb. 4.10 zeigt, dass das VHH-Fc Fusionsprotein ab einer Expressionsdauer von 48 Stunden in allen Expressionskulturen über die Interaktion mit Protein A-Biosensoren detektiert und die Proteinkonzentration jeder Kultur bestimmt werden konnte. Zur Verifizierung der Messungen wurde das Kulturvolumen jeder Kultur nach 120 Stunden berechnet, welches eine theoretische Proteinmenge von  $2 \mu\text{g}$  enthielt. Diese Proben wurden anschließend mittels Western-Blot analysiert. Sollte das Signal der Octet-Messung durch Messfehler zustande

gekommen sein, die zum Beispiel durch die Verwendung von hoch-viskosem PEG8000-haltigem Medium auftreten könnten, sollte sich dieser Umstand in der Western-Blot Analyse widerspiegeln. Durch Zentrifugation wurde die berechnete Menge Kulturüberstand von den Hefezellen abgetrennt, die Proteine mittels TCA präzipitiert (Kapitel 3.2.6) und anschließend für die Analyse mittels LDS-PAGE (Kapitel 3.2.9/10) und Western-Blot vorbereitet (Kapitel 3.2.11). Die Markierung der VHH-Fc Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte durch die Interaktion mit einem Fc-spezifischen Primärantikörper aus dem Kaninchen und einem Kaninchen-spezifischen Sekundärantikörper (POD-konjugiert) aus der Ziege. Die Ergebnisse der LDS-PAGE und der Western-Blot Analyse sind in Abb. 4.11 dargestellt.



**Abb. 4.11: LDS-PAGE und Western-Blot Analyse von Kulturüberständen aus APO-E und APO-B VHH-Fc Expressionskulturen.**

(A) LDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen von VHH-Fc Fusionsproteinen (Kulturüberstände) aus drei unabhängigen Expressionskulturen, Coomassie gefärbt. Als Kontrolle (+) wurden 2  $\mu$ g des Antikörpers Cetuximab verwendet. (B) Western-Blot Analyse der Proben aus (A). Detektion über einen Fc-spezifischen Primärantikörper (Kaninchen) und einem Kaninchen-spezifischen POD-konjugiert Sekundärantikörper (Ziege). Als Kontrolle (+) wurden 1  $\mu$ g Cetuximab verwendet.

Aus Abb. 4.11 geht hervor, dass das VHH-Fc Fusionsprotein erfolgreich in allen Proben mittels LDS-PAGE und Western-Blot Analyse nachgewiesen wurde. Im Falle der Western-Blot-Analyse erfolgte der Nachweis durch einen Fc-spezifischen Nachweisantikörper. Da die Signalstärken der Banden auf der Membran - optisch abgeschätzt - nahezu einheitlich waren, wurde davon ausgegangen, dass von jeder Expressionskultur eine annähernd identische Menge an Protein für die LDS-PAGE und die Western-Blot Analyse verwendet wurde. Da die für LDS-PAGE und Western-Blot Analyse eingesetzte Proteinmenge aus der zuvor durchgeführten Biolayer-Interferometrie Messung (Abb. 4.10) berechnet wurde, ließen sich damit die Signale der Biolayer-Interferometrie Messung bestätigen. Es wurde davon ausgegangen, dass die mittels Biolayer-Interferometrie erzielten Messwerte durch die spezifische Interaktion des VHH-Fc

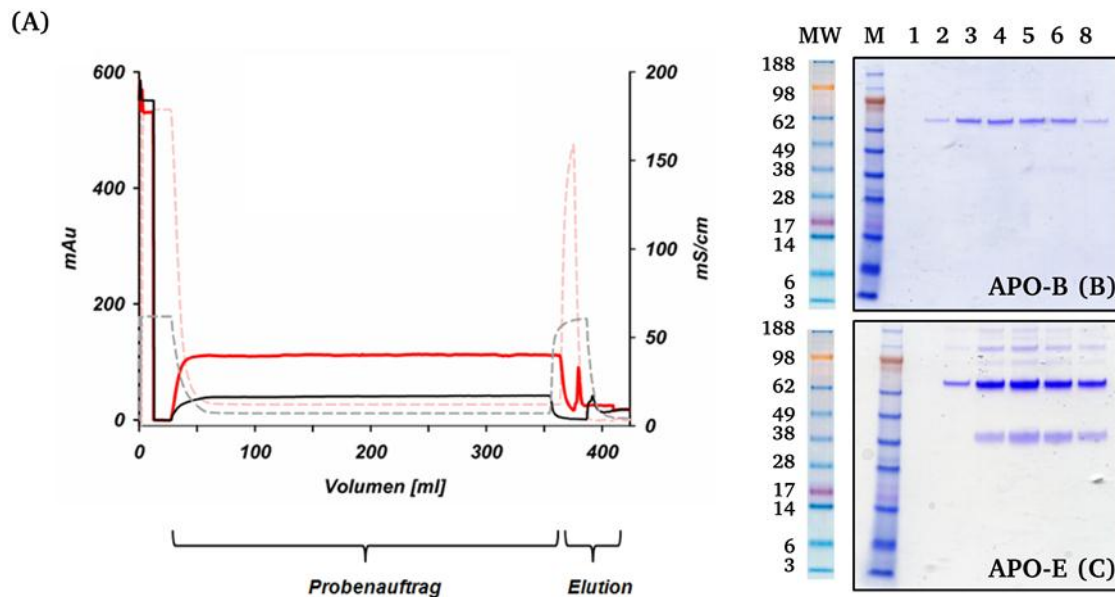
Fusionsproteins mit Protein A der Biosensor-Oberfläche zustande kamen und dass PEG8000 keinen störenden Einfluss auf die Messergebnisse hatte.

#### 4.5 Lösliche VHH-Fc Sekretion und Affinitätschromatographie

In einem weiteren Experiment wurde das VHH-Fc Fusionsprotein in einem größeren Maßstab produziert (Kapitel 3.1.13) und im Anschluss mittels Protein A-Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand gereinigt (Kapitel 3.2.1). Es wurde zusätzlich ein weiterer Vergleich der Sekretionsleistungen der Stämme APO-E und APO-B durchgeführt. Im Anschluss wurde die Funktionalität des gereinigten Proteins in Bezug auf die Interaktion mit dem spezifischen Antigen (hEGFR) untersucht, da aus der Literatur bekannt ist, dass Hefe-exprimierte Proteine oft hyperglykosyliert sind<sup>141</sup>. Hierzu wurden elektrokompente APO-E und APO-B Zellen mit dem Plasmid zur löslichen Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins (*pYD-pGal-app8-VHH1-Fc*) transformiert (Kapitel 3.1.8.1) und auf Selektivagarplatten selektiert. Ausgehend von einer Vorkultur wurde eine Expressionskultur mit einem Volumen von 200 ml inokuliert. Die Sekretion der VHH-Fc Fusionsproteinen erfolgte in Gegenwart von 11% (w/v) PEG8000 für 96 Stunden (Kapitel 3.1.13), da bereits gezeigt wurde, dass diese Kultivierungsdauer günstig für die Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteine war. Nach Abschluss der Expression verblieben ca. 185 ml Kulturvolumen. Durch Zentrifugation wurden die Hefezellen vom Kulturüberstand getrennt. Der Überstand wurde anschließend mit Protease-Inhibitor (PIC III) (1:1000) versetzt, um die Degradation des Proteins durch Proteasen im Kulturmedium zu verringern und in *Snakeskin™-Dialysesläuche* (MW 10 kD) (Thermo Scientific GmbH) überführt. Die Dialyse des Kulturüberstandes wurde wie in (Kapitel 3.2.19) beschrieben durchgeführt. Nach Abschluss der Dialyse wurde der Inhalt der einzelnen Dialysesläuche vereinigt und zur affinitätschromatographischen Reinigung des VHH-Fc Fusionsproteins mittels Protein A HiTrap 1 ml Säule (GE Healthcare Europe GmbH) verwendet (Kapitel 3.2.1). Das Volumen nach Abschluss der Dialyse betrug ca. 400 ml. Aufgrund der starken Volumenzunahme wurde eine Verringerung der Viskosität des Kulturüberstandes beobachtet. Da immer noch eine gewisse Restviskosität vorlag, konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass das PEG8000 nicht vollständig aus dem Überstand entfernt worden war. Die Verringerung der Viskosität war demnach eher auf die Verdünnung des Kulturüberstandes als auf den Austausch des PEG8000-haltigen Mediums gegen PBS zurückzuführen. Nach Abschluss der Reinigung und Sichtung des Chromatogramms (Abb. 4.12 A) wurden die jeweils relevanten Elutionsfraktionen vereinigt. Der Pufferaustausch gegen PBS erfolgte mit Hilfe von PD-10



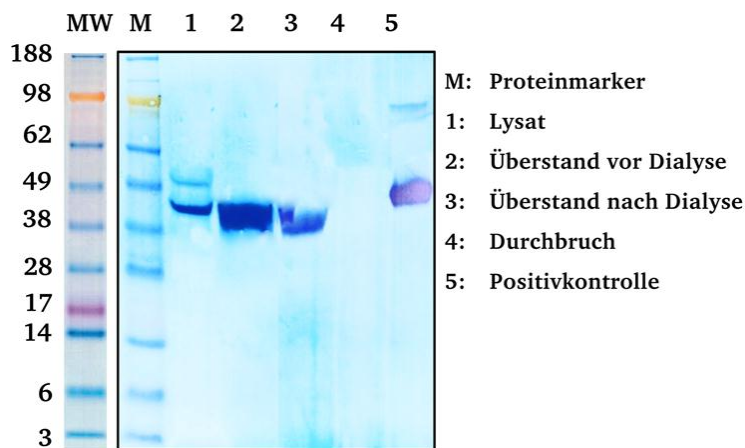
Säulen (Kapitel 3.2.2). Im Anschluss wurden je 20  $\mu$ l mittels LDS-PAGE (Kapitel 3.2.9/10) analysiert. Die Ergebnisse sind in (Abb. 4.12 B und C) dargestellt.



**Abb. 4.12: Reinigung von VHH-Fc Fusionsproteinen mittels Protein A-Affinitätschromatographie.**

(A) Chromatogramm der affinitätschromatographischen Reinigung mittels Protein A HiTrap Säule von VHH-Fc aus APO-E (rot) und APO-B (schwarz) 200 ml Expressionskulturen nach Dialyse gegen PBS. Die 1 ml Fraktionen der Elutions-Peaks aus (A) wurden vereinigt und mittels PD-10 Säulen in PBS umgepuffert. Durchgehende Linien repräsentieren die Absorption (mAu), unterbrochene Linien repräsentieren die Leitfähigkeit (mS/cm). (B) und (C) zeigen die Elutionsfraktionen der PD-10 Säule (je 500  $\mu$ l), die mittels LDS-PAGE (nicht-reduziert) analysiert wurden.

Die in Abb. 4.12 dargestellten Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Reinigung des VHH-Fc Fusionsproteins mittels Protein A-Affinitätschromatographie aus den Überständen von APO-E und APO-B Expressionskulturen. Die Analyse des gereinigten Proteins mittels LDS-PAGE ergab einen ausreichenden Reinheitsgrad (Abb. 4.12 B und C). Im Chromatogramm (Abb. 4.12 A) war bei beiden Proben ein Anstieg der Absorption während des Probenauftrags erkennbar. Für APO-E wurde eine maximale Absorption bei von 113,1 mAu und bei APO-B von 42,2 mAu detektiert. Die Absorption stieg im Falle des APO-E Überstandes auf einen fast doppelt so hohen Wert an, als beim APO-B Überstand erreicht wurde. Während des Probenauftrags wurde weder bei der APO-E (Abb. 4.13 Spur 4) noch der APO-B Probe (Daten nicht gezeigt) im Durchbruch mittels Western-Blot Analyse VHH-Fc Protein nachgewiesen. Somit konnte von einer vollständigen Bindung des VHH-Fc Proteins an die Säule ausgegangen werden.



**Abb. 4.13: Analytik zur Reinigung des VHH-Fc Fusionsproteins.**

Western-Blot Analyse (reduziert) von Expression und Reinigung des VHH-Fc Proteins aus dem Überstand einer 200 ml APO-E Kultur. Als Positivkontrolle wurde HEK293-produzierten VHH-Fc Fusionsprotein verwendet. Analysiert wurden Proben des Fusionsproteins zu verschiedenen Zeitpunkten des Reinigungsprozesses (s. Legende).

Während der Elution des Proteins von der Säule wurde bei beiden Proben ein deutlich abgegrenzter *Peak* detektiert, der sich über 7 ml (APO-E) bzw. 17 ml (APO-B) erstreckte. Die Analyse der Fraktionen des Pufferaustausches erfolgte mittels LDS-PAGE. Durch den optischen Vergleich der Signalstärken von APO-E und APO-B (vgl. Abb.4.12 B und C) konnte eine signifikant größere Proteinmenge in den Fraktionen von APO-E gegenüber APO-B festgestellt werden. Mittels Nanodrop (Kapitel 3.2.5) wurde die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 280 nm unter Einbeziehung des Molekulargewichts und des Extinktionskoeffizienten in den vereinigten Fraktionen bestimmt (Kapitel 3.2.5). Final wurden 0,34 mg des VHH-Fc Fusionsproteins aus einer 200 ml APO-E Expressionskultur und 0,1 mg aus einer 200 ml APO-B Expressionskultur mittels Protein A-Affinitätschromatographie isoliert. Die Analyse der Funktionalität des APO-E exprimierten Proteins ist im folgenden Kapitel dargestellt.



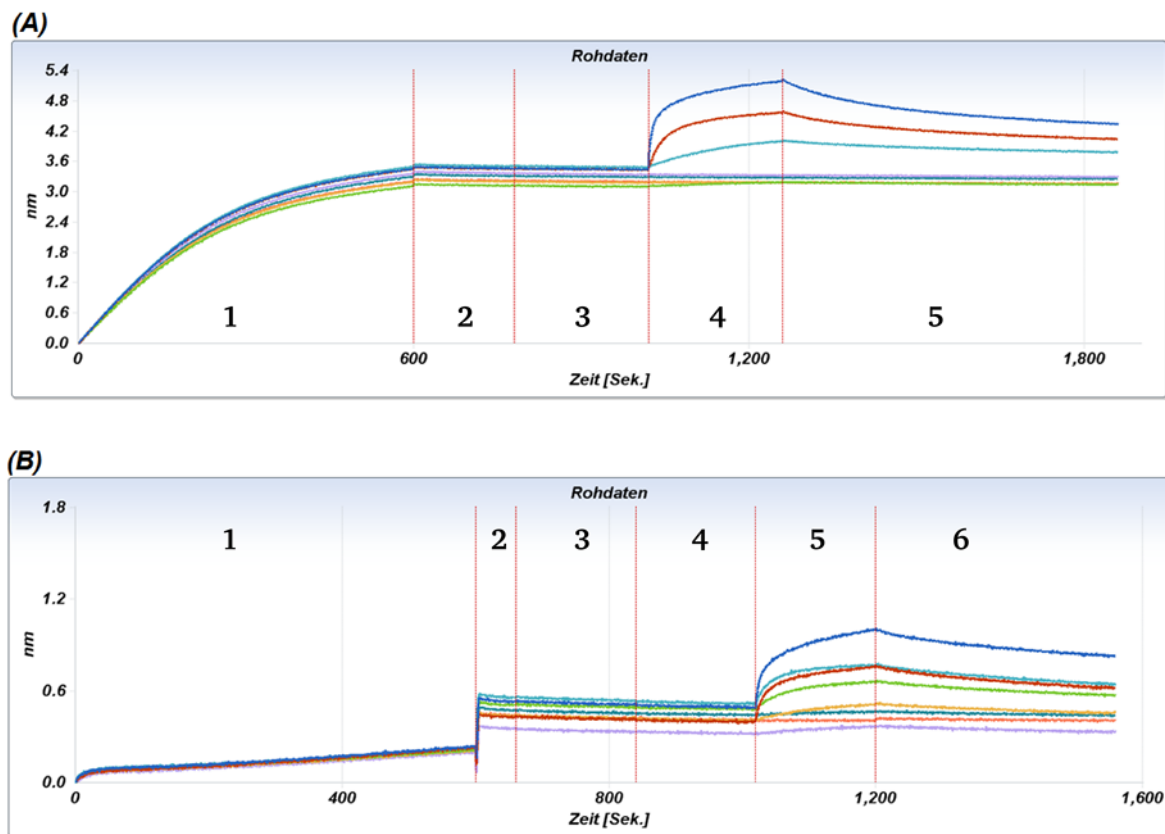
---

## 4.6 Funktionalitätsanalyse von Hefe-produzierten VHH-Fc Fusionsproteinen

---

Im Anschluss an die Reinigung des VHH-Fc Fusionsproteins aus dem Überstand der APO-E Kultur wurde die Funktionalität des Proteins überprüft. Da aus der Literatur bekannt ist, dass *S. cerevisiae* bestimmte Peptidsequenzen hyperglykosyliert<sup>141</sup> und das Einfluss auf Stabilität, Sekretion und biochemische Eigenschaften des Proteins haben kann, wurden die Bindungseigenschaften des VHH-Fc Proteins an das Antigen hsEGFR experimentell untersucht. Zu diesem Zweck wurden kinetische Messungen der hsEGFR-Interaktion mittels Biolayer-Interferometrie unter Verwendung von Protein A-Biosensoren durchgeführt (Kapitel 3.2.8). Im Vorfeld des Versuchs war bekannt, dass die VHH-Domäne eine hohe Spezifität und Affinität für das Antigen hsEGFR aufwies.

Zu diesem Zweck wurde das gereinigte VHH-Fc Fusionsprotein auf der Oberfläche von Protein A-Biosensoren immobilisiert (Abb. 4.14 A, Schritt 1). Dafür wurde das zuvor mittels Protein A-Affinitätschromatographie (Kapitel 4.5) gereinigte Protein verwendet. In einem weiteren Ansatz wurde der Kulturüberstand einer VHH-Fc Expressionskultur (Kapitel 3.1.13) zur Beladung der Protein A-Biosensoren verwendet. Im Anschluss an einen Waschschrift (Abb. 4.14 A, Schritt 2) erfolgte die Messung der Basislinie in PBS (Abb. 4.14 A, Schritt 3). Bei der Verwendung des Kulturüberstandes wurden zwei Waschschriffe durchgeführt (Abb. 4.14 B, Schritt 2 und 3), da dieser PEG8000 enthielt. Anschließend erfolgte die Assoziation mit löslichem Antigen hsEGFR in PBS (250 nM, 125 nM, 62,5 nM und 15,6 nM) (Abb. 4.14 A, Schritt 4; Abb. 4.14 B Schritt 5). Die Dissoziation von VHH-Fc Fusionsprotein und hsEGFR erfolgte in PBS (Abb. 4.14 A, Schritt 5; Abb. 4.14 B Schritt 6). Als Kontrolle wurde die Bindung der hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne an mmEGFR und hs-cMet analysiert, für welches die VHH-Domäne keine Spezifität aufwies. In diesem Fall wurde keine biomolekulare Interaktion mit den Antigenen mmEGFR und hs-cMet erwartet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 4.14 dargestellt.

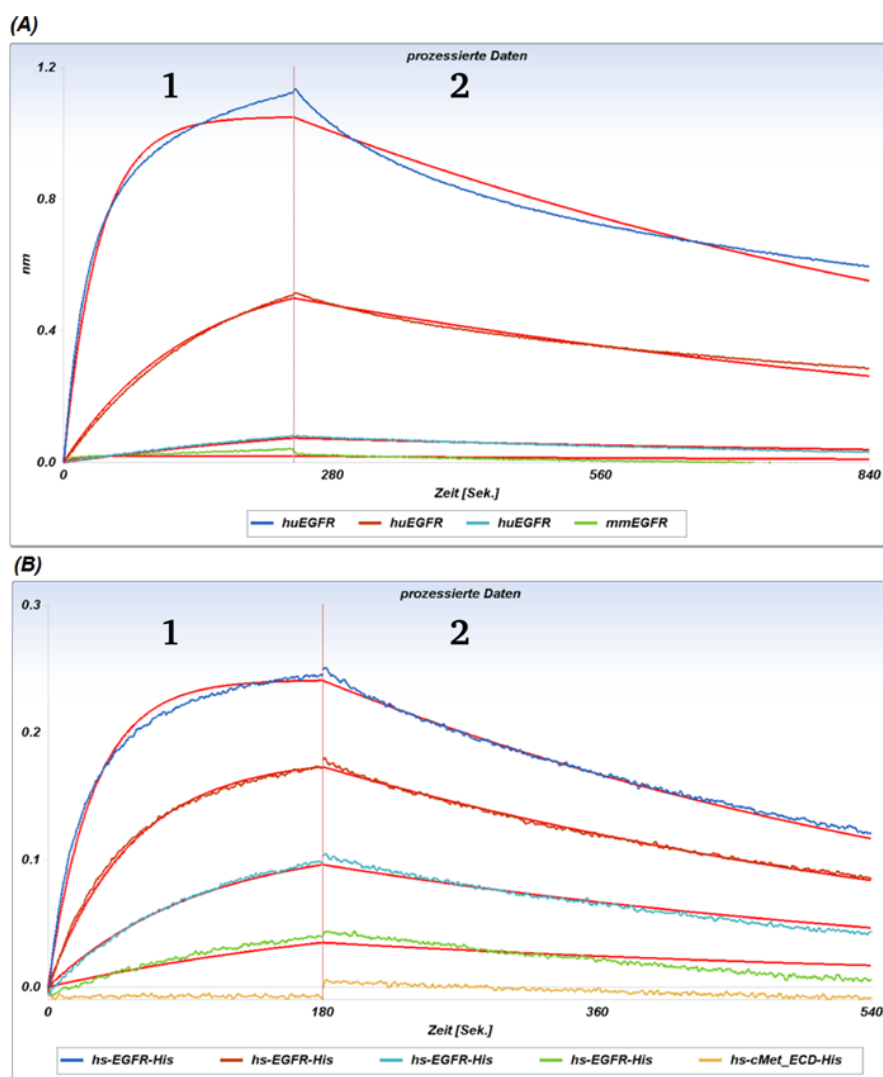


**Abb. 4.14: Analyse der Interaktion von VHH-Fc und hsEGFR – Biolayer-Interferometrie Messprofil (Rohdaten).**

Rohdaten des Biolayer-Interferometrie Messprofils von gereinigtem VHH-Fc Fusionsprotein (**A**) und VHH-Fc aus dem Überstand (**B**) an hsEGFR. Gezeigt sind die Messprofile von acht Protein A-Biosensoren. (**1**) Beladung der Protein A-Biosensoren mit dem VHH-Fc für 600 s. (**A 2 bis 3**): Waschschrift, (**B 2 bis 4**): Waschschrift, (**A 4, B 5**) Assoziation, (**A 5, B 6**): Dissoziation.

Eine erfolgreiche Beladung der Protein A-Biosensoren war sowohl mit dem gereinigten Protein als auch mit dem Protein-haltigen Kulturüberstand möglich. Die Beladung war durch einen kontinuierlichen Signalanstieg in den ersten 600 Sekunden zu erkennen (Abb. 4.14 A und B, Schritt 1). Da das gereinigte Protein in einer sehr viel höheren Konzentration zur Beladung der Biosensoren eingesetzt werden konnte als das im Kulturüberstand vorhandene Protein, stiegen die Sensorsignale in diesem Fall mit einer deutlich größeren Steigung an und die Sensoren konnten stärker beladen werden. Es wurde eine Schichtdicke von 3,1 bis 3,5 nm erreicht. Die Beladung der Sensoren mit Kulturüberstand erreichte eine geringere Schichtdicke von durchschnittlich 0,2 nm (Abb. 4.14 B). Der horizontale Verlauf der Sensorsignale während der nachfolgenden Waschschriffe deutet auf eine stabile Beladung hin (Abb. 4.14 A Schritt 2 bis 3 B Schritt 2 bis 4). In Abb. 4.14 B ist ein deutlicher Sprung der Signale zwischen Beladung und erstem Waschschrift zu erkennen. Dieser Befund ist auf den

Pufferwechsel zurückzuführen, der durch das Eintauchen der Sensoren von Kulturmedium (+PEG8000) in PBS hervorgerufen wurde. Dieser Sprung war in Abb. 4.14 A nicht zu sehen, da das Protein zur Beladung bereits in PBS gelöst vorlag. Die Assoziation von löslichem hsEGFR an die mit VHH-Fc beladenen Sensoren ist in Schritt 4 (Abb. 4.14 A) und Schritt 5 (Abb. 4.14 B) gezeigt. Während der Assoziation kam es in beiden Fällen zu einem deutlichen Anstieg der Sensorsignale. Dieser Anstieg repräsentierte die spezifische Bindung von hsEGFR an die mit VHH-Fc beladene Sensoroberfläche. Zur Analyse der kinetischen Konstanten der Interaktion zwischen VHH-Fc und hsEGFR wurde ein statistisches *Fitting* der experimentellen Daten durchgeführt (Abb. 4.15). Die kinetischen Konstanten sind in Tab. 4.1 angegeben.



**Abb. 4.15: Bindungsanalyse von VHH-Fc und hsEGFR (prozessierte Daten).**

Kinetische Charakterisierung der biomolekularen Interaktion von VHH-Fc und hsEGFR. Gezeigt sind die prozessierten Sensorgramme. Assoziation (1) und Dissoziation (2) von hsEGFR an das auf der Sensoroberfläche immobilisierte VHH-Fc Fusionsprotein. Gereinigtes VHH-Fc Protein in PBS (A) und VHH-Fc in Kulturüberstand (B). Negativkontrollen: (A) mmEGFR, (B) hs-cMet. Proteinkonzentrationen sind einzeln aufgeführt. Bunte Kurven zeigen die experimentell ermittelten Daten, rote Kurven zeigen das statistische *Fitting* dieser Daten.

Tab. 4.1: Kinetische Konstanten der Bindung zwischen VHH-Fc und hsEGFR.

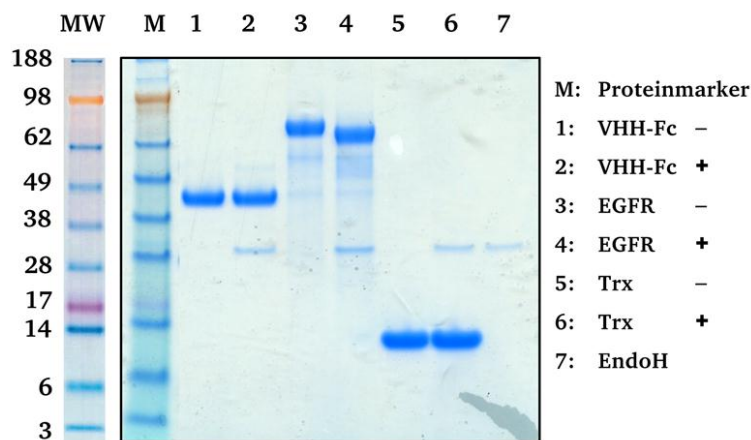
	$k_a$ (1/Ms)	$k_a$ error	$k_d$ (1/s)	$k_d$ error	$K_D$ (M)
PBS	$1,06 \times 10^5$	$8,13 \times 10^2$	$9,47 \times 10^{-4}$	$4,56 \times 10^{-6}$	$8,91 \times 10^{-9}$
Überstand	$1,55 \times 10^5$	$1,12 \times 10^3$	$1,86 \times 10^{-3}$	$8,03 \times 10^{-6}$	$1,20 \times 10^{-8}$

Abb. 4.15 zeigte in beiden Fällen eine spezifische, konzentrationsabhängige Interaktion zwischen immobilisiertem VHH-Fc an der Sensoroberfläche und hsEGFR. Es kam nicht zu einer Interaktion zwischen VHH-Fc und den Kontrollproteinen mmEGFR und cMet. Die Analyse der Bindung von VHH-Fc und hsEGFR mittels Biolayer-Interferometrie zeigte deutlich die Affinität der VHH-Domäne für das Antigen. Die Assoziation zwischen VHH-Domäne und hsEGFR ist in Abb. 4.15 durch den charakteristischen Anstieg der bunten Kurven gekennzeichnet. Die Dissoziation von hsEGFR erfolgte im Anschluss in PBS und war durch den kontinuierlichen langsamen Abfall der bunten Kurven gezeigt. Durch die Analyse von Assoziation und Dissoziation wurde die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Protein-Protein-Interaktion berechnet. Unter Verwendung von gereinigtem Protein wurde ein  $K_D$ -Wert von  $0,9 \times 10^{-8}$  M gemessen (Abb. 4.15 A). Die Verwendung von Kulturüberstand ergab ein  $K_D$ -Wert von  $1,2 \times 10^{-8}$  M (Abb. 4.15 B). In einer zuvor durchgeführten Messung des VHH-Fc Proteins aus dem Mediumüberstand einer HEK293-Expressionskultur wurde ein  $K_D$ -Wert von  $8,4 \times 10^{-8}$  M ermittelt. Diese Daten wurden freundlicherweise von Dr. Achim Doerner (TU Darmstadt, AK Prof. Kolmar) zu Verfügung gestellt und sind hier nicht gezeigt. Bei dem HEK293-exprimierten Protein handelte es sich um eine N-terminale Fc-Fusion der hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne.

#### 4.7 Glykosylierung des VHH-Fc Proteins

Die Analyse der Glykosylierung des Hefe-sekretierten Proteins aus Kapitel 4.5 erfolgte mittels LDS-PAGE (Kapitel 3.2.9) und vorheriger Inkubation des Proteins mit dem Enzym Endoglykosidase H (EndoH) (Kapitel 3.2.3). EndoH spaltet spezifisch Mannose-reiche Oligosaccharide der N-Glykosylierung von Proteinen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die heterologe Expression in Hefezellen zur N-Glykosylierung mit einer hohen Anzahl an terminalen Mannoseresten führt<sup>141</sup>. Diese sogenannte Hypermannosylierung kann einen Einfluss auf Sekretion, Löslichkeit und Faltung des Proteins haben<sup>142</sup>. Es wurden 2  $\mu$ g des aus der Hefe sekretierten Proteins mit EndoH inkubiert und das Molekulargewicht und das Laufverhalten des Proteins im Polyacrylamidgel mittels LDS-PAGE analysiert. Zur Kontrolle

wurden zusätzlich 2  $\mu\text{g}$  der Proteine hsEGFR und Thioredoxin ebenfalls mit EndoH inkubiert und analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.16 dargestellt.



**Abb. 4.16: VHH-Fc Glykosylierungsanalyse.**

LDS-PAGE des Hefe-sekretierten VHH-Fc Proteins mit (+) und ohne (-) EndoH. Als Kontrollen wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  folgender Proteine unter gleichen Bedingungen mit EndoH behandelt: hsEGFR (aus CHO) und Thioredoxin (aus *E. coli*)

Durch die Inkubation mit EndoH und die anschließende Analyse mittels LDS-PAGE konnte kein Unterschied im Laufverhalten des behandelten VHH-Fc Fusionsproteins festgestellt werden (Abb. 4.16 Spur 1 und 2). Durch Inkubation von hsEGFR mit EndoH wurde eine Verringerung des Molekulargewichts durch ein unterschiedliches Laufverhalten des Proteins im Polyacrylamidgel festgestellt (Spur 3 und 4). Thioredoxin zeigte aufgrund der fehlenden Glykosylierung keine Veränderung im Molekulargewicht (Spur 5 und 6). Dies deutete darauf hin, dass keine detektierbare Hypermannosylierung des sekretierten VHH-Fc Proteins vorlag.

In den bis hier dargestellten Ergebnissen wurde die lösliche Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen gezeigt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die genetische Manipulation des Stammes EBY100 die chromosomale Überexpression der Oxidoreduktase PDI erreicht wurde. Durch die Integration der PDI-Expressionskassette in das Genom von EBY100 wurde der *S. cerevisiae* Stamm APO-E generiert. Unter Verwendung dieses Expressionsstammes konnte eine für biochemische Analysen ausreichende Menge des VHH-Fc Fusionsproteins produziert werden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass das APO-E-produzierte VHH-Fc Fusionsprotein die erwartete Spezifität und Affinität für das Antigen hsEGFR zeigte. Durch den Vergleich der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Hefe-produzierten Proteins und des HEK293-produzierten Proteins wurden vergleichbare Werte ermittelt, was auf eine reproduzierbare Funktionalität des Hefe-produzierten Proteins hindeutete.

---

Da der Aspekt der löslichen VHH-Fc Produktion jedoch nur einen Teil des hier vorgestellten schaltbaren nicht-kovalenten Verfahrens zur Oberflächenpräsentation darstellt, sind in den nachfolgenden Kapiteln die Ergebnisse zur Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne und von VHH-Fc Fusionsproteinen und IgG-Molekülen gezeigt.

#### 4.8 Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne

Die Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen wurde durch die Co-Expression einer Fc-Bindedomäne vermittelt. Diese wurde zur Oberflächenpräsentation auf Hefezellen als Fusionsprotein mit dem Hefe-eigenen Zellwandprotein Aga2p exprimiert und diente so als direkter Vermittler der Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen. Zu diesem Zweck wurde die Fc-Bindedomäne in den zu Beginn der experimentellen Arbeiten kommerziell erhältlichen Vektor zur Oberflächenpräsentation von Proteinen auf Hefezellen *pYD1* (Invitrogen) kloniert. Es wurden zwei verschiedene Varianten der Fc-Bindedomäne hergestellt und bezüglich ihres Expressionsverhaltens und ihrer Funktionalität miteinander verglichen. In diesem Zusammenhang bezieht sich die Funktionalität auf das Bindungsvermögen der Domänen für Fc-Teile von humanen IgG-Molekülen. Hierfür wurde die Z-Domäne<sup>67</sup> in monovalenter und in divalenter Form als Aga2p-Fusion exprimiert und auf der Oberfläche von EBY100 Zellen exponiert. Die Z-Domäne leitet sich vom *S. aureus* Protein A ab, bindet den Fc-Teil diverser IgG Subtypen<sup>143</sup> und besteht aus einer  $\alpha$ -helikalen Struktur<sup>69</sup>. Bei der ZZ-Domäne handelt es sich um eine Duplizierung der Sequenz der Z-Domäne. In der Literatur wird der divalenten ZZ-Domäne eine deutlich höhere Affinität für Fc-Teile von humanen IgG-Molekülen zugesprochen als der monovalenten Z-Domäne. Diese höhere Affinität wird größtenteils durch eine deutlich niedrigere  $K_{off}$  realisiert<sup>144</sup>. Zur Verdeutlichung sind in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 4.2) die 1995 von Jendeborg und Mitarbeitern mittels Plasmon Resonanz Detektion (BIAcore™) ermittelten kinetischen Konstanten der biomolekularen Interaktion von Fc mit Z- und ZZ-Domäne aufgelistet<sup>144</sup>.

Tab. 4.2: Kinetische Konstanten der Interaktion der Fc-Bindedomänen mit IgG-Fc.

Fc-Bindedomäne	$k_a$ (1/Ms $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s $\times 10^{-3}$ )
Z-Domäne (monovalent)	$1,9 \pm 0,6$	$3,2 \pm 1$
ZZ-Domäne (divalent)	$3,5 \pm 1,0$	$0,51 \pm 0,2$

#### 4.9 Klonierungsstrategie der Fc-Bindedomäne

Für die Konstruktion der Plasmide zur Oberflächenpräsentation der zwei Varianten der Fc-Bindedomäne wurde mittels Literaturrecherche die Aminosäuresequenz der Z-Domäne ermittelt<sup>67</sup> und die entsprechende DNA-Sequenz in den Vektor *pYD1* in den Leserahmen von Aga2p kloniert. Zwischen Aga2p und Fc-Bindedomäne wurde der im *pYD1*-Vektor enthaltene flexible GS-Linker erhalten. Zur Konstruktion der ZZ-Domäne wurde die Sequenz der Z-

Domäne zweimal hintereinander C-terminal in den Leserahmen von Aga2p kloniert. Dazu wurde die Sequenz der ZZ-Domäne synthetisiert (Geneart AG) und in den Vektor *pYD1* kloniert (Geneart AG). Die Z-Domäne wurde aus einem intern zu Verfügung gestellten pET13-basierten Plasmid amplifiziert und mittels konventioneller Klonierungstechniken durch Restriktion von DNA und Ligation von DNA-Fragmenten (Kapitel 3.3.6 u. 3.3.10) über die Schnittstellen *Bam*HI und *Nhe*I in den Vektor *pYD1* kloniert.

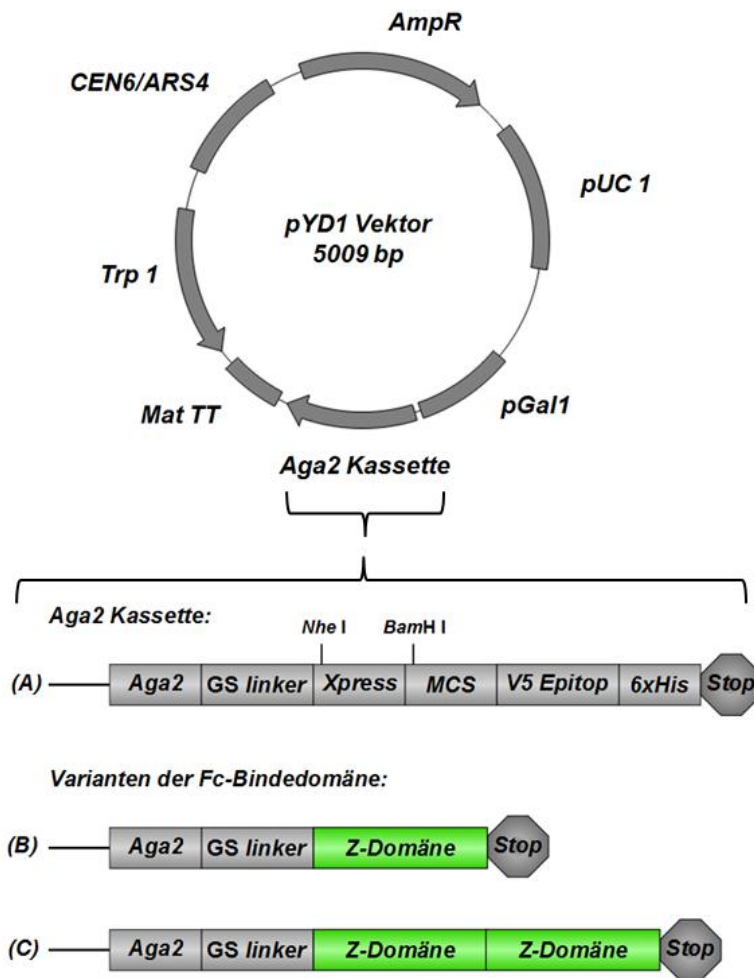


Abb. 4.17: Klonierungsschema zur Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomänen.

Schematische Darstellung Vektors *pYD1* für die Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne (Z- und ZZ-Domäne) als Aga2p-Fusionsprotein. (A) zeigt die einzelnen Komponenten der Aga2p-Kasette. Die Klonierung der Z-Domäne erfolgte über die in (A) gezeigten Restriktionsschnittstellen *Nhe*I und *Bam*HI. (B) zeigt das Konstrukt Aga2p-Z-Domäne. (C) zeigt das Konstrukt Aga2p-ZZ-Domäne.

Beide Vektoren (*pYD-Z* und *pYD-ZZ*) wurden ohne die im *pYD1* Vektor enthaltenen Affinitätspeptide generiert (Abb. 4.17), sodass Z- und ZZ-Domäne ohne weitere Modifikationen und nur über einen GS-Linker mit dem Zellwandprotein Aga2p auf der Zelloberfläche verankert wurden.



#### 4.10 Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne

Um zu überprüfen, welche Variante der Fc-Bindedomäne am besten für die nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von Fc-Fusionsproteinen geeignet war, wurden EBY100 Zellen einerseits mit dem Plasmid *pYD-Z* und andererseits mit dem Plasmid *pYD-ZZ* transformiert (Kapitel 3.1.8.1). Als Kontrolle wurden EBY100 Zellen mit dem Plasmid *pYD1* (Invitrogen) transformiert (Kapitel 3.1.8.1). Als Membrananker für die Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne wurde der Rezeptor  $\alpha$ -Agglutinin aus *S. cerevisiae* verwendet. Dieser Oberflächenrezeptor auf Hefezellen unterteilt sich in zwei Proteine, Aga1p und Aga2p, die über Disulfidbrücken verknüpft sind, und gewährleistet so die kovalente Verankerung der Fc-Bindedomäne auf der Zelloberfläche. Hier wurde das von Boder und Wittrup etablierte Verfahren der Oberflächenpräsentation auf Hefezellen verwendet<sup>92</sup>. Aga1p ist zu diesem Zweck chromosomal im Genom von EBY100 kodiert und steht, wie das episomal kodierte Aga2p unter Kontrolle des Galaktose-induzierbaren Gal1-Promotors. In Gegenwart von Galaktose wird die Expression von *AGA1* (Aga1p) und *AGA2* (Aga2p) initiiert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die *AGA2* Expression als Fusion mit der Z- bzw. ZZ-Domäne (Abb. 4.18).

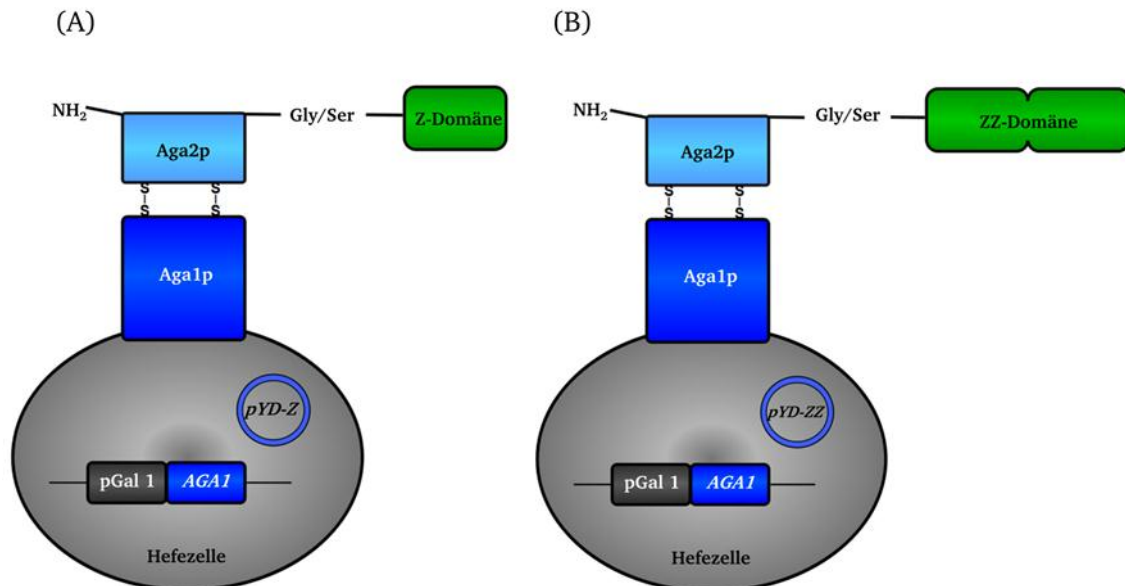


Abb. 4.18: Aga2p-vermittelte Oberflächenpräsentation von Z- und ZZ-Domäne.

Oberflächenpräsentation der monovalenten Z-Domäne (A) und der divalenten ZZ-Domäne (B) jeweils als Aga2p-Fusion. Aga1p ist chromosomal kodiert und die *AGA1* Expression wird durch den Galaktose-induzierbaren Gal1-Promotor (*pGal1*) reguliert. Die Aga2p-Fusionen sind episomal kodiert (*pYD-Z* bzw. *pYD-ZZ*). Ihre Expression ist ebenfalls durch den Gal1-Promotor reguliert. Z-Domäne und ZZ-Domäne sind über einen Glycin-Serin-Linker (Gly/Ser) mit dem C-Terminus von der Untereinheit Aga2p verbunden.

Die Expression der Oberflächenpräsentation erfolgte wie in Kapitel 3.1.13 dargestellt bei 20 °C für 72 Stunden. Nach Bestimmung der Zelldichte (Kapitel 3.1.7) wurden  $1 \times 10^7$  Zellen entnommen und die Varianten der Fc-Bindedomäne auf der Zelloberfläche markiert (Kapitel 3.1.15). Die Markierung erfolgte durch Bindung eines FITC-konjugierten Protein A-spezifischen Antikörpers aus der Ziege. Dieser Antikörper wurde auf Grund seiner Spezies-Herkunft nicht über seinen Fc-Teil gebunden<sup>145</sup>. Stattdessen erfolgte die Bindung über Epitope auf den Fc-Bindedomänen, die von dem Antikörper erkannt wurden. Die so vorbereiteten Zellen wurden anschließend mittels Durchflusszytometrie im Durchflusszytometer Guava easyCyte HT 2L (Kapitel 3.1.17) analysiert. Der prozentuale Anteil an Zellen, die die Fc-Bindedomäne präsentierten wurde über die Definition einer Markerregion M1 bestimmt. Die Markerregion wurde so gewählt, dass möglichst wenige Zellen der Negativkontrolle (Abb. 4.19, Aga2p) innerhalb dieser Region lokalisiert waren. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um EBY100 Transformatanten, die nur das Ankerprotein Aga2p präsentierten. In Abb. 4.19 sind die Histogramme der Messungen dargestellt.

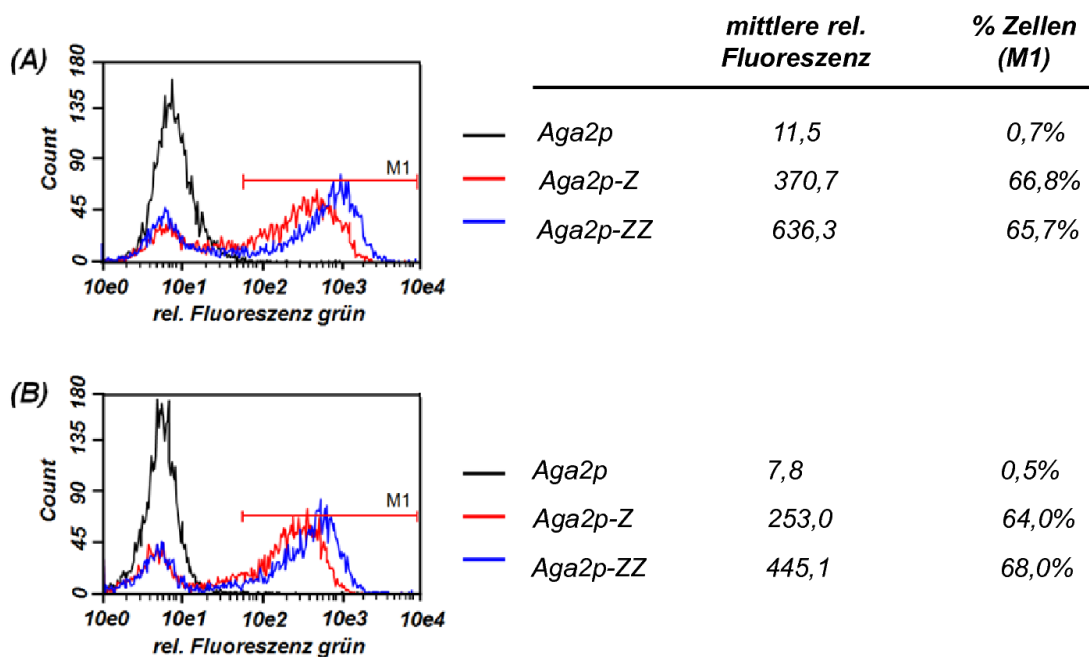
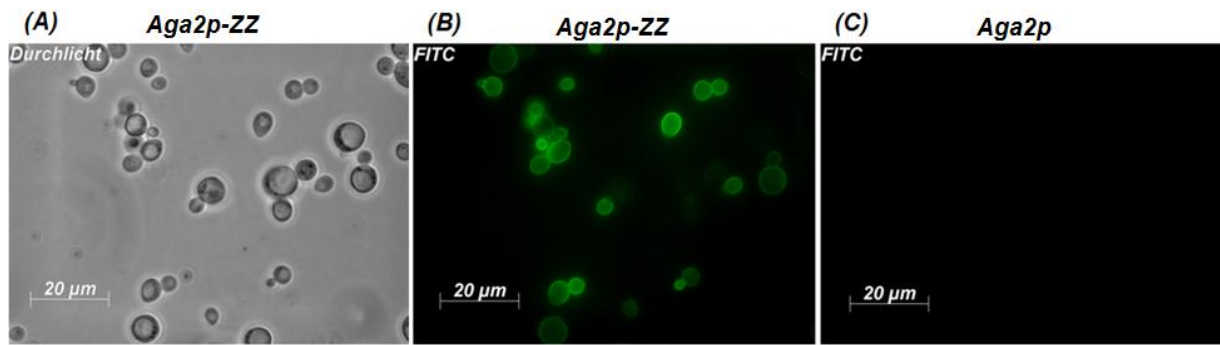


Abb. 4.19: Durchflusszytometrie und Oberflächenpräsentation von Z- und ZZ-Domäne auf EBY100 Zellen.

Durchflusszytometrische Analysen von EBY100 Zellen die Aga2p, Aga2p-Z und Aga2p-ZZ auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte mittels Protein A-spezifischen FITC-konjugiertem Nachweisantikörper aus der Ziege nach 24 Stunden Expression **(A)** und 72 Stunden Expression **(B)**. Zusätzlich ist die mittlere rel. Fluoreszenzintensität der Konstrukte und der prozentuale Anteil an Zellen innerhalb der Markerregion M1 angegeben.

Wie in Abbildung 4.19 A und B zu erkennen ist, konnten sowohl Z- als auch ZZ-Domäne mit dem Protein A-spezifischen Antikörper über einen Zeitraum von 72 Stunden markiert und durchflusszytometrisch detektiert werden. Durch die Expression als Aga2p-Fusionsproteine wurden sie auf der Zelloberfläche über die Interaktion von Aga1p und Aga2p präsentiert. Bereits nach 24 Stunden zeigten beide Varianten ein im Vergleich zur Negativkontrolle (Aga2p) stärkeres rel. Fluoreszenzsignal. Zellen, die die divalente ZZ-Domäne präsentierten, zeigten ein fast doppelt so starkes Signal als Zellen mit der monovalenten Z-Domäne (vgl. 370,7 und 636,3). Dieser Befund ist durch das Vorhandensein einer doppelten Anzahl von spezifischen Epitopen durch die Sequenzduplizierung zu erklären. Dieser Zustand zeigte sich auch noch nach 72 Stunden, wobei zu diesem Zeitpunkt die Signalstärken beider Varianten um ca. 30% abnahmen (vgl. 253,0 und 445,1). Für beide Varianten wurden jeweils zwei verschieden große Zellpopulationen mit unterschiedlichen relativen Signalintensitäten detektiert. Die kleineren Zellpopulationen zeigten eine Signalintensität, die der Negativkontrolle entsprach (Aga2p). Die Signale der größeren Zellpopulationen wiesen signifikant höhere Intensitäten auf. Dadurch konnten sie deutlich von der Negativkontrolle unterschieden werden. Daraus wurde geschlossen, dass die innerhalb von M1 lokalisierten Zellen die Fc-Bindedomäne auf ihrer Oberfläche präsentierten und so spezifisch markiert werden konnten. Zur Visualisierung der Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne wurden Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen angefertigt (Kapitel 3.1.18).

Zu diesem Zweck wurden  $1 \times 10^7$  EBY100 Zellen (*pYD-ZZ* Transformanten) nach einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden in Galaktose-haltigem SD-Medium mit einem Protein A-spezifischen Antikörper (FITC-Konjugat) aus der Ziege markiert (Kapitel 3.1.15). Als Kontrolle dienten EBY100 Zellen, die mit dem Plasmid *pYD1* (Invitrogen) transformiert wurden und die ebenfalls mit dem Protein A-spezifischen Antikörper (FITC-Konjugat) aus der Ziege inkubiert wurden (Abb. 4.20 C). In der Fluoreszenz-mikroskopischen Analyse zeigten nur Zellen ein positives Fluoreszenzsignal, die die ZZ-Domäne auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die fotografische Darstellung der mikroskopischen Aufnahmen ist in Abbildung 4.20 gezeigt.

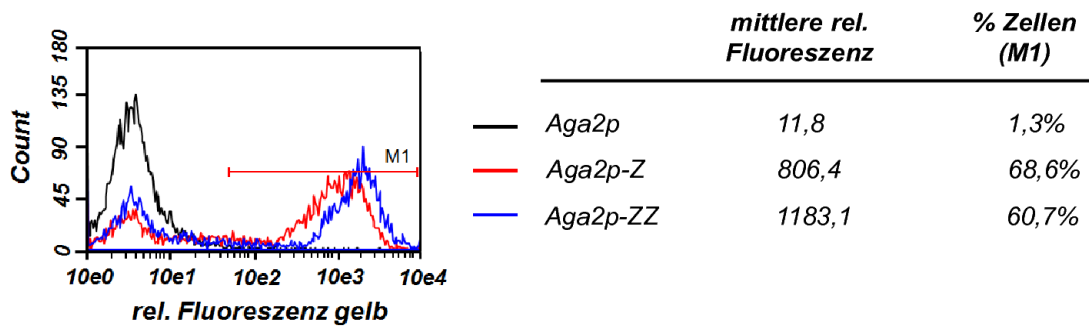


**Abb. 4.20 Durchlicht u. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von ZZ-präsentierenden Zellen.**

Durchlicht (A) und Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme (B) von Aga2p-ZZ präsentierenden EBY100 Zellen und Aga2p präsentierenden EBY100 Zellen (C) gezeigt. Die Detektion erfolgte in (B) und (C) mit einem Protein A-spezifischen FITC-konjugierten Antikörper aus der Ziege.

Die Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme (Abb. 4.20 B) zeigt im Vergleich mit der Negativkontrolle (Abb. 4.20 C), dass die Oberflächen-präsentierte ZZ-Domäne mit dem FITC-konjugierten Antikörper spezifisch markiert wurde. Im Vergleich mit der Durchlicht-Aufnahme (Abb. 4.20) wurde festgestellt, dass nicht alle Zellen der Probe markiert werden konnten. Dieser Befund bestätigte erneut die in Abb. 4.19 gezeigten FACS-Histogramme, die zeigten, dass in jeder Expressionskultur eine separate Zellpopulation detektiert wurde, die die relative Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle aufwies und die somit aus unbekannten Gründen nicht die ZZ-Domäne präsentierte.

Zusätzlich zur Markierung mit dem Protein A-spezifischen Nachweisantikörper wurde die Oberflächenpräsentation beider Varianten auf funktioneller Basis experimentell untersucht. Darunter wurde die Bindung eines IgG-Moleküls verstanden. Mit diesem Experiment wurde die Variante identifiziert, die für die nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen am besten geeignet war, da innerhalb des nicht-kovalenten Verfahrens die löslich sekretierten VHH-Fc Fusionsproteine von der auf der Zellwand verankerten Fc-Bindedomäne eingefangen werden sollten. Beide Varianten wurden mit dem Antikörper Cetuximab (1  $\mu$ M) markiert, der über den Fc-Anteil von der Z- bzw. ZZ-Domäne gebunden wurde. Die Fluoreszenzmarkierung wurde anschließend über die Interaktion von Cetuximab mit dem biotinylierten Antigen hEGFR (1  $\mu$ M) und dem Konjugat SA-PE (Streptavidin-R-Phycoerythrin) durchgeführt (Kapitel 3.1.15). Die Detektion der Fluoreszenz-markierten Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie im Guava easycyte HT (Kapitel 3.1.16). Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.21 dargestellt.



**Abb. 4.21: IgG-Bindung durch Z- und ZZ-Domäne und Durchflusszytometrie.**

Durchflusszytometrische Analyse von Z- und ZZ-Domänen präsentierenden EBY100 Zellen (pYD-Z und pYD-ZZ Transformanten) nach 24 Stunden Expression. Die Markierung erfolgte mit dem Antikörper Cetuximab (1  $\mu$ M), b-hsEGFR (1  $\mu$ M) und dem SA-PE. Gezeigt ist zusätzlich die mittlere rel. Fluoreszenz sowie der prozentuale Anteil an Zellen innerhalb der Markerregion M1. Negativkontrolle: Aga2p (pYD1-Transformanten).

Grundsätzlich waren sowohl Z- als auch ZZ-Domäne über die Bindung von Cetuximab detektierbar. Daraus wurde geschlossen, dass sowohl Z- als auch ZZ-Domäne funktionell auf der Oberfläche von EBY100 Zellen präsentiert wurden. Im FACS-Histogramm (Abb. 4.21) ließen sich erneut zwei Zellpopulationen verschiedener Fluoreszenzintensität unterscheiden. Die kleinere Population (Aga2p-Z: 31,4%, Aga2p-ZZ: 39,3%) zeigte ein schwächeres Signal, welches der der Negativkontrolle (Abb. 4.21, Aga2p) entsprach. Die größere Population (Aga2p-Z: 68,6%, Aga2p-ZZ: 60,7%) zeigte ein deutlich stärkeres Signal. Bei dieser handelte es sich vermutlich um die Zellen, die Aga2p-Z und Aga2p-ZZ auf der Oberfläche präsentierten und die über die Bindung von Cetuximab spezifisch markiert wurden. Durch den Einsatz einer größeren Menge von Cetuximab konnte der prozentuale Anteil an Zellen in M1 nicht erhöht werden (Daten nicht gezeigt). Insofern lag eine vollständige Sättigung der Fc-Bindedomänen mit Cetuximab vor. Wie schon zuvor wurde auch durch die Bindung eines IgG-Moleküls sichtbar, dass die divalente ZZ-Domäne unter gleichen Bedingungen ein deutlich stärkeres relatives Fluoreszenzsignal zeigte als die monovalente Z-Domäne.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Oberflächen-präsentierte divalente ZZ-Domäne signifikant stärker mit dem Protein A-spezifischen Antikörper und mit dem Antikörper Cetuximab markiert wurde als die monovalente Z-Domäne. Dementsprechend wurde die ZZ-Domäne als Fc-Bindedomäne für alle weiteren Experimente gewählt. Die nächsten Abschnitte befassen sich mit den Ergebnissen der experimentellen Untersuchung zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen und IgG-Molekülen.

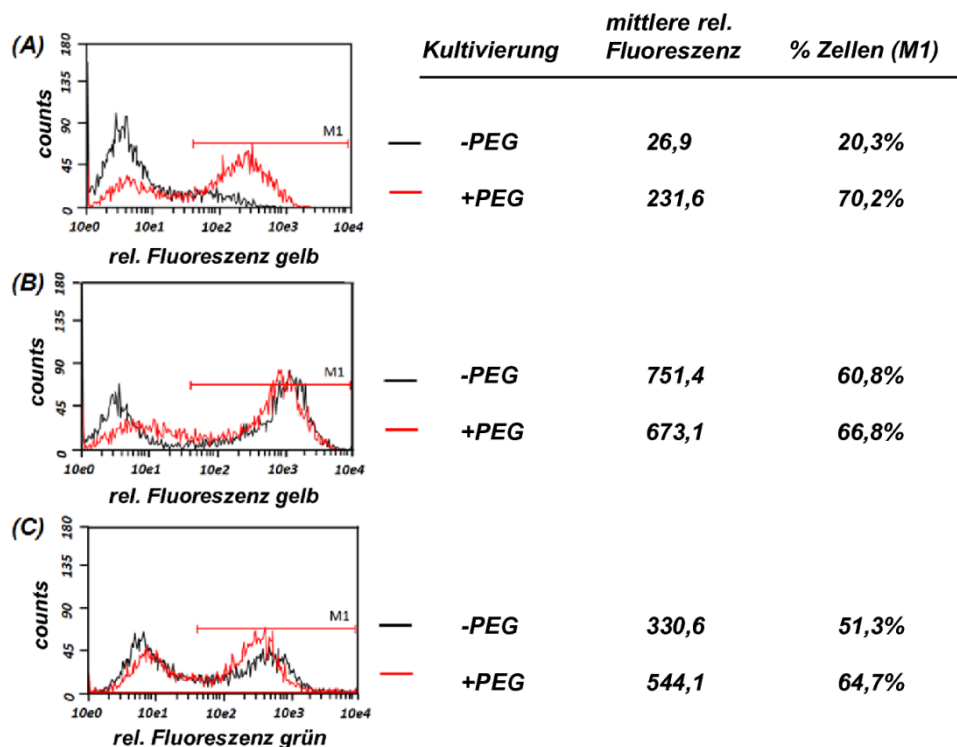
---

#### 4.11 Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen

---

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die erfolgreiche Präsentation der ZZ-Domäne auf EBY100 Zellen gezeigt. Diese zeigte zusätzlich eine hinreichende Funktionalität in Bezug auf die Bindung von humanen IgG-Molekülen. Durch die Verwendung des Stammes APO-E wurde gezeigt, dass VHH-Fc Fusionsproteine in einem ausreichenden Maßstab für die Reinigung und die Charakterisierung des Proteins hergestellt werden konnten. Durch die Verwendung des Mediumzusatzes PEG8000 wurde ebenfalls gezeigt, dass im Vergleich zur Sekretion ohne den Mediumzusatz PEG8000 die Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen signifikant erhöht wurde. Die nachfolgenden Kapitel stellen die Ergebnisse der Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsprotein, vermittelt durch die ZZ-Domäne auf EBY100 Zellen sowie die experimentellen Analyse der Genotyp-Phänotyp-Kopplung dar. Diese Ergebnisse zeigen die erfolgreiche Zusammenführung der löslichen Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins und der Präsentation der ZZ-Domäne zum nicht-kovalenten Verfahren der Oberflächenpräsentation von Antikörpern auf Hefezellen.

Für die Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen wurden elektrokompetente EBY100 Zellen mit den Plasmiden *pYD-ZZ* (Präsentation der Fc-Bindedomäne) und *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* (Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins) transformiert (Kapitel 3.1.8.1). Die simultane Expression beider Konstrukte wurde über die Kultivierung der Zellen in Galaktose-haltigem Medium induziert. Zur Analyse des Einflusses von PEG8000 auf die Oberflächenpräsentation des VHH-Fc-Proteins wurden verschiedene Expressionskulturen hergestellt, die sich in ihrem PEG8000-Gehalt unterschieden (ohne PEG8000 (-PEG), 11% (w/v) (+PEG)). Die Kultivierung der Zellen wurde wie in Kapitel 3.1.13 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen mittels Fluoreszenzmarkierung (Kapitel 3.1.14) und Durchflusszytometrie im Guava easyCyte HT 2L (Kapitel 3.1.16) analysiert. Die Markierung der VHH-Domäne auf der Zelle erfolgte über die spezifische Interaktion mit dem biotinylierten Antigen hEGFR (1  $\mu$ M) und SA-PE (Abb. 4.22 A und B). Die Markierung der ZZ-Domäne auf der Zelle wurde mit einem Protein A-spezifischen FITC-konjugierten Antikörper aus der Ziege (Abb. 4.22 C) durchgeführt.



**Abb. 4.22: Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen.**

Die Oberflächenpräsentation wurde durch die auf der Zelloberfläche kovalent-verankerte ZZ-Domäne vermittelt. Die Zellen wurden in (A) und (B) mit b-hsEGFR/SA-PE markiert. In (A) ist das Ergebnis der FACS-Analyse ohne (-PEG) und mit PEG8000 Zusatz (+PEG) nach 24 Stunden, in (B) nach 72 Stunden dargestellt. Die Markierung erfolgte mittels b-hsEGFR und SA-PE. (C) zeigt die Detektion der ZZ-Domäne beider Kulturen nach 24 Stunden durch die Markierung mit einem Protein A-spezifischen FITC-konjugierten Antikörper aus der Ziege.

Abb. 4.22 zeigt, dass das VHH-Fc Fusionsprotein durch die Interaktion mit dem biotinyliertem Antigen hsEGFR auf der Oberfläche von EBY100 Zellen markiert werden konnte. Dieser Befund galt sowohl für Zellen, die in Medium ohne PEG8000 (-PEG) als auch für Zellen, die in Medium mit PEG8000 (+PEG) kultiviert wurden. Ein Unterschied zwischen den Proben beider Kulturen bestand in der Intensität des detektierten mittleren relativen Fluoreszenzsignals für die markierte VHH-Domäne. Am deutlichsten war dieser Unterschied nach 24 Stunden zu erkennen (Abb. 4.22, A: -PEG: 26,9; +PEG: 231,6). Zu diesem Zeitpunkt konnten innerhalb der +PEG Zellen mehr als dreimal so viele Zellen markiert werden als innerhalb der analysierten -PEG Zellen (Abb. 4.22 A). Nach weiteren 48 Stunden glichen sich sowohl die Fluoreszenzintensitäten als auch der prozentuale Anteil an VHH-Fc präsentierenden Zellen bei +PEG und -PEG Zellen an. Nach 72 Stunden präsentierten 60,8% der -PEG Zellen und 66,8% der +PEG Zellen das VHH-Fc Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche (Abb. 4.22 B).

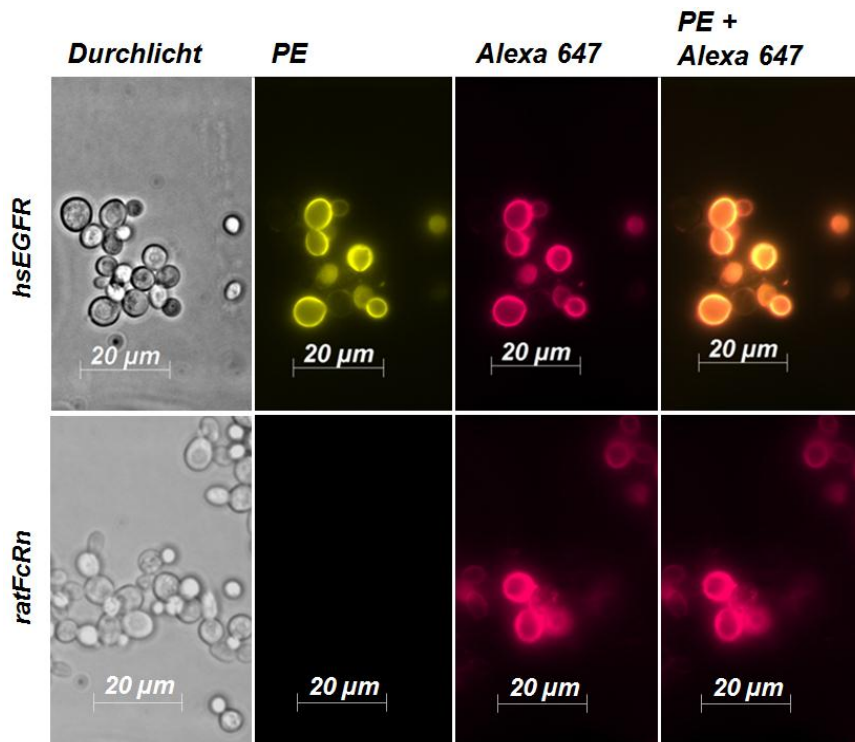


Zur genaueren Untersuchung des Befunds, dass nach 24 Stunden lediglich 20,3% der –PEG Zellen das VHH-Fc Protein präsentierten, wurden die Zellen aus Abb. 4.22 A zusätzlich zur Markierung mit hEGFR noch mit dem Protein A-spezifischen Antikörper-FITC Konjugat aus der Ziege markiert. Es wurde vermutet, dass die im Vergleich zu den +PEG Zellen suboptimale Oberflächenpräsentation des VHH-Fc Fusionsproteins auf eine ebenfalls suboptimale Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne zurückzuführen sei. Diese Annahme wurde durch die Markierung mit einem Protein A-spezifischen Antikörper widerlegt. Nach 24 Stunden war die ZZ-Domäne sowohl auf der Oberfläche von +PEG Zellen als auch von –PEG Zellen ausreichend präsentiert (Abb. 4.22 C). Das geringere VHH-Fc Signal in Abb. 4.22 A war demnach nicht auf eine ungenügende Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne zum Einfangen der VHH-Fc Fusionsproteine zurückzuführen. Dieses Experiment zeigte die Möglichkeit der erfolgreichen nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen durch die Interaktion mit der ZZ-Domäne und verdeutlichte den positiven Effekt von PEG8000 im Kulturmedium auf die Präsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen. Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Experimente ausschließlich PEG8000-haltiges Medium für die nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen verwendet.

Zur Visualisierung der Oberflächenpräsentation des VHH-Fc Fusionsproteins wurden Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen der +PEG Zellen angefertigt. Zu diesem Zweck wurden EBY100 Zellen mit den Plasmiden *pYD-ZZ* (Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne) und *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* (lösliche Sekretion des VHH-Fc Proteins) transformiert (Kapitel 3.1.8.1). Die Genexpression erfolgte unter den üblichen Bedingungen für 48 Stunden (Kapitel 3.1.13). Im Anschluss wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit  $1 \mu\text{M}$  b-hsEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen  $\text{F(ab')}_2$  Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) sequentiell markiert (Kapitel 3.1.15). Als Kontrolle erfolgte die Markierung der Zellen mit biotinylierten rFcRn (*Rattus norvegicus*) (b-rFcRn), für welches die VHH-Domäne keine Spezifität zeigte. Die Markierung der Oberflächen-präsentierten VHH-Fc Fusionsproteine auf der Hefezelle vermittelt durch die Aga2p-fusionierte ZZ-Domäne ist durch die Interaktion mit b-hsEGFR und SA-PE sichtbar. Diese Zellen erschienen in der fotografischen Aufnahme der Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung gelblich (Abb. 4.23, Spalte PE). Zusätzlich wurde die Oberflächenpräsentation über die Bindung eines Fc-spezifischen  $\text{F(ab')}_2$  AlexaFluor™ 647-Konjugats detektiert. Diese Zellen erschienen in der fotografischen Aufnahme der Fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung rötlich und repräsentieren die Markierung des Fc-Teils des Fusionsproteins (Abb. 4.23, Spalte: Alexa 647). Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale zeigte das



Vorhandensein des VHH-Fc Fusionsproteins und dessen Funktionalität vermittelt durch die spezifische Bindung des Antigens. Diese Zellen sind in der Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahme orange dargestellt (Abb. 4.23, Spalte: PE + Alexa 647). Eine Zusammenfassung der fotografischen Darstellung ist in der folgenden Abb. 4.23 gezeigt.



**Abb. 4.23: Durchlicht u. Fluoreszenz-mikroskopische Analyse von VHH-Fc präsentierenden Zellen.**

Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von EBY100 Zellen, die, vermittelt durch die ZZ-Domäne, das VHH-Fc Fusionsprotein auf ihrer Oberfläche präsentierten. Die Zellen wurden zum einen mit b-hsEGFR/SA-PE (Reihe: hsEGFR) und zum anderen mit b-rFcRn (*Rattus norvegicus*)/SA-PE (Reihe: ratFcRn) markiert (Spalte: PE). Zusätzlich erfolgte eine weitere Markierung mit einem Fc-spezifischen Antikörper (Spalte: Alexa 647). Die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale ist in der Spalte PE + Alexa 647 gezeigt.

Aus den in Abb. 4.23 dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass die VHH-Fc Fusionsproteine, vermittelt durch die ZZ-Domäne, auf der Oberfläche von EBY100 Zellen erfolgreich präsentiert wurden. Die Spezifität der VHH-Domänen konnte durch die Bindung an b-hsEGFR nachgewiesen werden. Es wurde kein Fluoreszenzsignal der Zellen für die Bindung an b-rFcRn detektiert. Das unterstützt die in Abb. 4.22 gezeigten Ergebnisse der FACS-Analysen und zeigt, dass die präsentierten VHH-Domänen als Fc-Fusion auf der Oberfläche von Hefezellen ihre Funktionalität beibehielten.

Um die Vielseitigkeit des Verfahrens der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen zu demonstrieren, wurde in einem weiteren Experiment die Oberflächenpräsentation von vollständigen IgG-Molekülen untersucht. Die Präsentation von IgG-Molekülen erfordert die funktionelle Assemblierung von vier Proteinketten und die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der einzelnen Proteinketten und untereinander.

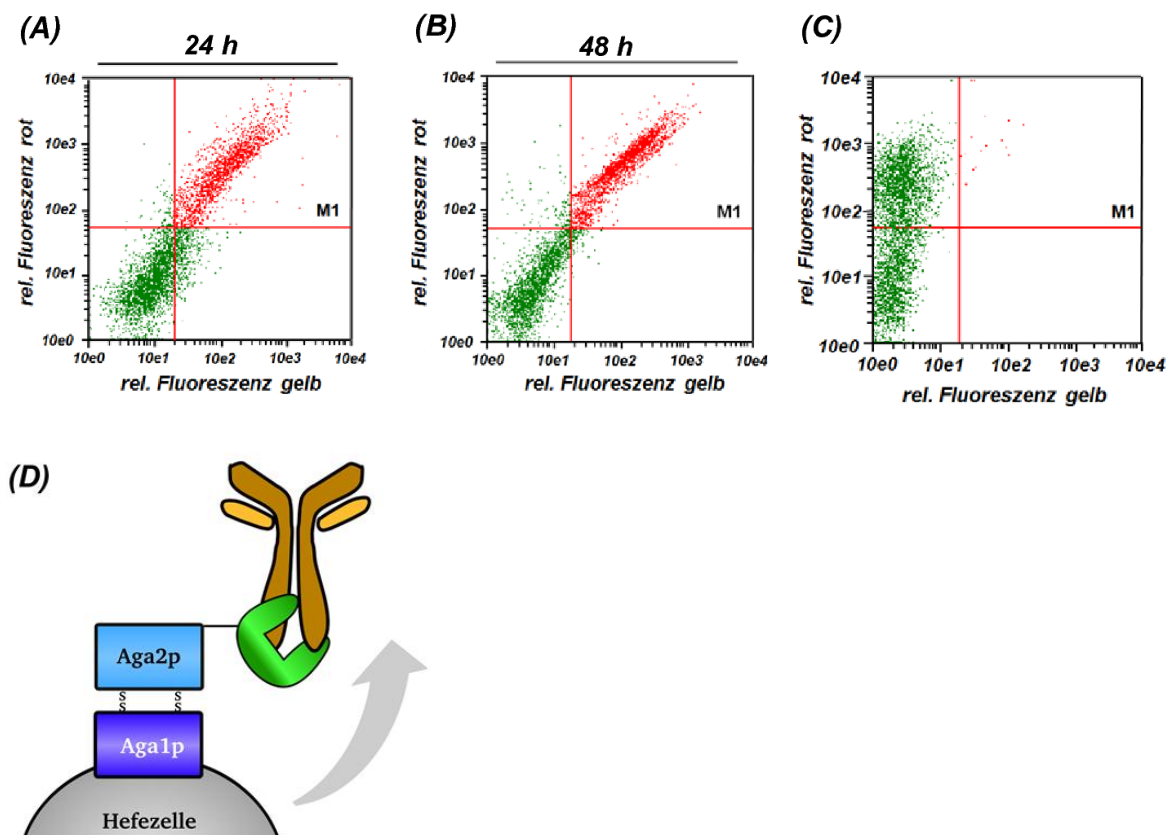
---

#### 4.12 Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen

---

Bis zu diesem Punkt konnten VHH-Fc Fusionsproteine erfolgreich über die Interaktion mit der ZZ-Domäne auf der Oberfläche von EBY100 Zellen präsentiert werden. Daraus ergab sich die Fragestellung, ob es auch möglich war, komplexere Moleküle wie vollständige IgG-Moleküle über die ZZ-Domäne zu präsentieren. Im Vorfeld wurde vermutet, dass die Assemblierung von leichter und schwerer IgG-Kette zu einer verschlechterten Oberflächenpräsentation des Antikörpers im Vergleich zu VHH-Fc Fusionsproteinen führen könnte, da die Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen lediglich die Assemblierung von zwei identischen Proteinketten erfordert. Zur Analyse der Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen wurden elektrokompente EBY100 Zellen mit den Plasmiden *pYD-gGal1-app8-HC*, *pYD-gGal1-app8-LC* und *pYD-ZZ-G418* (Kapitel 2.5) transformiert (Kapitel 3.1.8.1) und auf geeigneten Selektivagarplatten selektiert. Da der *S. cerevisiae* Stamm EBY100 nur über zwei freie Auxotrophiemarker (Trp/Leu) zur Transformation verfügte, erfolgte die Selektion des Plasmids *pYD-ZZ-G418* über den Resistenzmarker G418. Zu diesem Zweck wurde der Auxotrophiemarker des Plasmids mittels homologer Rekombination mit der Resistenzkassette *kanMX4* substituiert. Hierzu wurde die *kanMX4*-Kassette aus dem Plasmid *pFA6a-kanMX4* (Biochemie, TU Darmstadt, AK Prof. Kolmar) mit den Oligodesoxyribonukleotiden *GR-kanMX4-up* und *GR-kanMX4-rp* amplifiziert und in den mittels *Bsu36I* linearisierten Vektor *pYD-ZZ* kloniert. Die Sequenzbereiche des Fab-Fragments kodierten für den hEGFR-spezifischen Antikörper Matuzumab (Merck Serono); die für den Fc-Teil kodierende Sequenz wurde von dem Antikörper Cetuximab übernommen. Im Fc-Teil war die an Position 297 lokalisierte Aminosäure Asparagin zu Glutamin mutiert worden (Kapitel 3.3.5.1) um die von der Hefe bekannte Hypermannosylierung während der N-Glykosylierung zu vermeiden. Des Weiteren wurden schwere und leichte IgG-Kette über das Signalpeptid *app8* sekretiert. Die Expressionskultur fasste ein Volumen von 3 ml und wurde in geeignetem Galaktose-haltigem SD-Medium +PEG8000 durchgeführt. Die Expression erfolgte für 48 Stunden in der Vertiefung einer 6-well Platte bei 20 °C. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zelldichte der

Kultur bestimmt und  $1 \times 10^7$  Zellen entnommen. Die Markierung der Zellen erfolgte mit biotinyliertem Antigen hEGFR und SA-PE. Die Markierung des Fc-Teils erfolgte mit einem Fc-spezifischen  $F(ab')_2$  Fragment (AlexaFluor647™-Konjugat) aus der Ziege. Die so vorbereiteten Zellen wurden im Anschluss im Guava easyCyte HT 2L durchflusszytometrisch analysiert (Kapitel 3.1.17). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.24 dargestellt. Als Kontrolle wurde die Markierung ohne das spezifische Antigen durchgeführt. Die Markerregion (M1) wurde so definiert, dass für die Messung der Kontrolle kein Signal innerhalb von M1 detektiert wurden (Abb. 4.24 C).



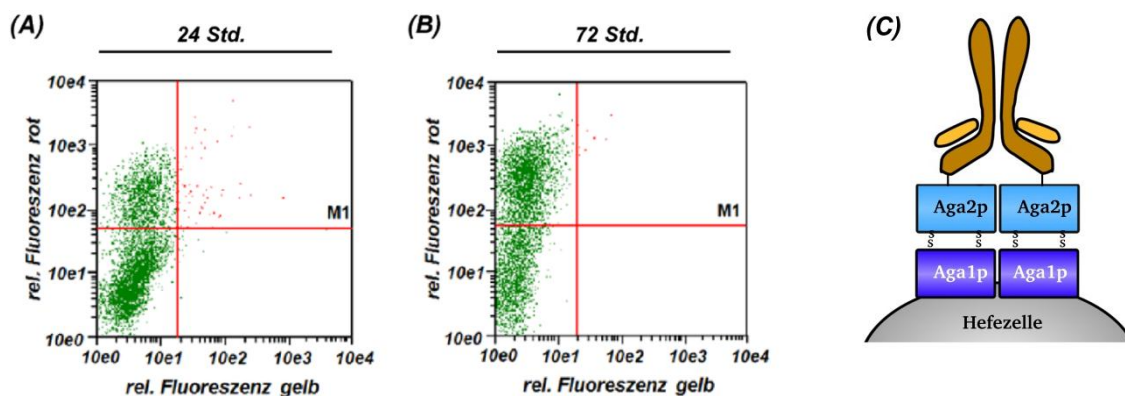
**Abb. 4.24: Nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen.**

Zwei-Farben-Markierung und Durchflusszytometrie nach (A) 24 und (B) 48 Stunden. Die gelbe Fluoreszenz (rel. Fluoreszenz gelb) zeigt das Signal für Phycoerythrin und damit die Bindung von b-hsEGFR; die rote Fluoreszenz (rel. Fluoreszenz rot) zeigt das Signal für AlexaFluor 647™ (Fc-Signal). 24 Stunden: 36,4% der Zellen innerhalb der Markerregion M1, 48 Stunden: 43,4% der Zellen innerhalb der Markerregion M1. (C) Kontrolle: Zellen aus (A) markiert mit SA-PE. 0,2% der Zellen innerhalb der Markerregion M1. (D) zeigt stark vereinfacht die Oberflächenpräsentation des IgG-Moleküls durch die über Aga2p (hellblau) und Aga1p (dunkelblau) kovalent-verankerte ZZ-Domäne (grün). Der graue Pfeil deutet auf die lösliche Sekretion von leichter und schwerer IgG-Kette hin.

Aus Abb. 4.24 geht hervor, dass der Antikörper Matuzumab (IgG-Molekül) erfolgreich auf der Oberfläche von EBY100 Zellen, vermittelt durch die ZZ-Domäne, präsentiert werden konnte,

da die Spezifität des Antikörpers über die Bindung an das Antigen (hsEGFR) nachgewiesen werden konnte. Sowohl nach 24 Stunden (Abb. 4.24 A) als auch nach 48 Stunden (Abb. 4.24 B) wurde ein im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 4.24 C) deutlich stärkeres relatives Fluoreszenzsignal (M1) detektiert. Nach 48 Stunden hatte sich der prozentuale Anteil an IgG-präsentierenden Zellen im Vergleich zur 24 Stunden Messung um sieben Prozent erhöht. Es wurde angenommen, dass die Bindung von hsEGFR auf der Zelle nur bei Vorhandensein von schwerer und leichter IgG-Kette erfolgte, weshalb von einer vollständigen Oberflächenpräsentation des IgG-Moleküls ausgegangen wurde.

In einem weiteren Experiment wurde die Oberflächenpräsentation des Antikörpers Matuzumab in einem anderen Ansatz analysiert. Zu diesem Zweck wurden elektrokompente Zellen mit den Plasmiden *pYD-Aga2p-HC* und *pYD-pGal1-app8-LC* (Kapitel 2.5) transformiert und auf geeigneten Selektivagarplatten selektiert. In diesem Experiment wurde die schwere IgG-Kette als Aga2p-Fusion exprimiert, während die leichte Kette löslich mithilfe des app8 Signalpeptids sekretiert wurde. Aus einer stationären Vorkultur wurde im Anschluss eine 50 ml Expressionskultur mit Galaktose-haltigem SD-Medium + PEG8000 hergestellt und die Zellen 72 Stunden unter den üblichen Bedingungen kultiviert (Kapitel 3.1.13). Nach 24 und 72 Stunden wurden  $1 \times 10^7$  Zellen mit  $1 \mu\text{M}$  b-hsEGFR und SA-PE und einem Fc-spezifischen  $\text{F(ab')}_2$  Fragment AlexaFluor™ 647 markiert und durchflusszytometrisch im Durchflusszytometer Guava easyCyte HT 2L untersucht. Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.25 gezeigt.



**Abb. 4.25: Kovalente Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen.**

Zwei-Farben-Markierung von IgG präsentierenden EBY100 Zellen nach (A) 24 Stunden und (B) 72 Stunden. Die gelbe Fluoreszenz (rel. Fluoreszenz gelb) zeigt das Signal für SA-PE und damit die Bindung des biotinylierten Antigens (b-hsEGFR); die rote Fluoreszenz (rel. Fluoreszenz rot) zeigt das Signal für AlexaFluor™ 647 (Fc-spezifischer Antikörper). (C) zeigt stark vereinfacht die theoretisch angenommene Oberflächenpräsentation des IgG-Moleküls als kovalente Aga2p-Fusion im Falle einer erfolgreichen Assemblierung von leichter und schwerer IgG-Kette.

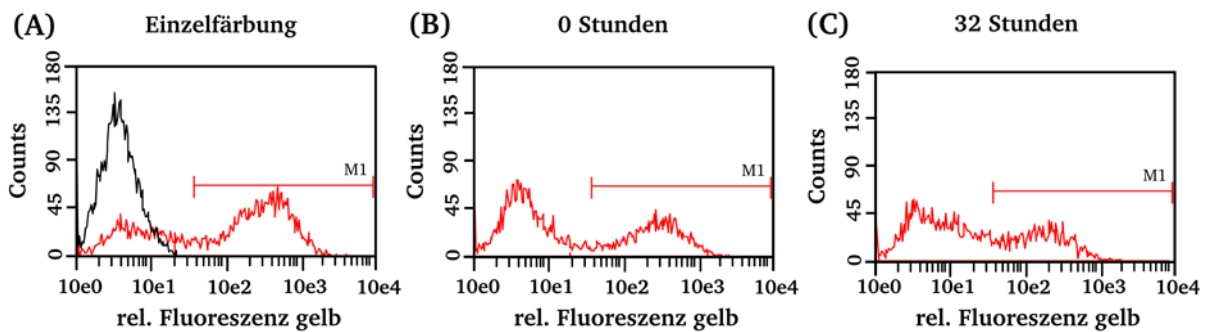
Die FACS-Analyse (Abb. 4.25) der Zellen zeigte, dass zwar der Fc-Teil des IgG-Moleküls spezifisch detektiert werden konnte (rel. Fluoreszenz rot), nicht aber die Bindung von biotinyliertem Antigen hsEGFR (rel. Fluoreszenz gelb). Daraus ließ sich schließen, dass das IgG-Molekül nicht-funktionell auf der Oberfläche präsentiert wurde. Zwar konnte nach 72 Stunden eine ca. 28% größere Zellpopulation im Vergleich zu 24 Stunden mit dem Fc-spezifischen Antikörper detektiert werden, trotz allem konnte aber auch durch eine verlängerte Expressionsdauer keine spezifische Antigen-Bindung nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der ZZ-vermittelten Präsentation, war die Oberflächenpräsentation von Matuzumab in diesem Ansatz als kovalente Aga2p-Fusion der schweren Kette nicht erfolgreich.

---

#### 4.13 Stabilitätsanalyse der VHH-Fc:ZZ-Interaktion

---

Zur Analyse der Stabilität der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen durch die Interaktion mit der ZZ-Domäne wurde die Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen über einen Zeitraum von 32 Stunden durchflusszytometrisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden elektrokompente EBY100 Zellen mit den Plasmiden *pYD-ZZ* und *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* (Kapitel 2.5) transformiert (Kapitel 3.1.8.1) und auf Selektivagarplatten selektiert. Die Expression der Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsprotein erfolgte für 48 Stunden (Kapitel 3.1.13). Nach Abschluss der Expression und Bestimmung der Zelldichte der Kultur wurden  $2 \times 10^7$  Zellen entnommen und in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und 100  $\mu$ l der Zellsuspension in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Beide Proben wurden pelletiert und in 20  $\mu$ l PBS resuspendiert. Eine Probe wurde mit b-hsEGFR (1  $\mu$ M) und SA-PE markiert (Kapitel 3.1.12). Die andere Probe wurde nicht markiert. Beide Proben wurden wie in Kapitel 3.1.17 erläutert durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.26 A) und anschließend zu gleichen Teilen gemischt. Die Zellmischung wurde mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und bei 4 °C im Dunkeln für 32 Stunden gelagert. Zu definierten Zeitpunkten (Abb. 4.27) wurden Zellen der Mischung entnommen und durchflusszytometrisch untersucht und die mittlere relative Fluoreszenz bestimmt. Direkt nach dem Mischen der Zellen wurde ebenfalls eine Messung durchgeführt, um die initiale mittlere relative Fluoreszenzintensität der Mischung zu bestimmen (Abb. 4.26 B). Diese mittlere relative Fluoreszenzintensität wurde hypothetisch als 100%-Wert definiert. Die FACS-Histogramme der Proben vor dem Mischen, 1:1 gemischt und nach 32 Stunden, sind in Abb. 4.26 dargestellt.

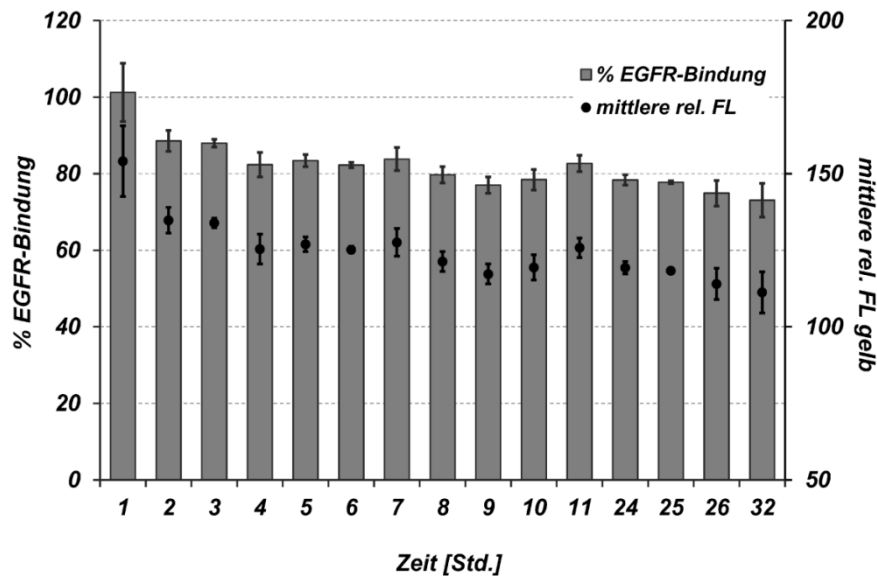


**Abb. 4.26: FACS-Analyse der Stabilität der VHH-Fc:ZZ-Interaktion.**

FACS-Histogramme von VHH-Fc präsentierenden EBY100 Zellen. **(A)** Oberflächenpräsentation von VHH-Fc markiert (rot) und Oberflächenpräsentation von VHH-Fc nicht-markiert (schwarz). **(B)** Initiale 1:1 Mischung zum Zeitpunkt  $T_0$ . **(C)** 1:1 Mischung nach 32 Stunden. Detektion des VHH-Fc Fusionsproteins über b-hsEGFR und SA-PE.

In Abb. 4.26 A sind die Fluoreszenzsignale der Fluoreszenz-markierten EBY100 Zellen (rot) und der nicht-markierten (schwarz) EBY100 Zellen gezeigt. Die beiden Proben zeigten deutlich unterschiedliche mittlere relative Fluoreszenzintensitäten (schwarz: 23,9, rot: 260,3). Die markierte Probe (Abb. 4.26 A, rot) zeigte einen Anteil von 30,1% Zellen, die dem relativen Fluoreszenzsignal der nicht-markierten Probe entsprach. Diese Zellen waren nicht innerhalb der Markerregion M1 lokalisiert und präsentierten nicht das VHH-Fc Protein. Durch das Mischen beider Proben wurde der prozentuale Anteil dieser Zellen erhöht (Abb. 4.26 B). Hier zeigten 56,4% der Zellen eine relative Fluoreszenzintensität entsprechend der nicht-markierten Probe (Abb. 4.26 A, schwarz). Nach 32 Stunden Lagerung der Mischung bei 4 °C und unter Lichtausschluß sind die prozentualen Verhältnisse annähernd gleich geblieben, allerdings haben sich die *Peak*-Formen im FACS-Histogramm verändert. Die *Peaks* sind im Vergleich zur initialen Messung (Abb. 4.26 B) weniger deutlich voneinander abgegrenzt (Abb. 4.26 C). In der Abb. 4.27 sind die gemessenen mittleren relativen Fluoreszenzintensitäten zu den definierten Zeitpunkten gegen die Zeit aufgetragen.





**Abb. 4.27: VHH-Fc:ZZ Interaktion über einen Zeitraum von 32 Stunden.**

Graphische Darstellung der mittleren relativen Fluoreszenz der M1-Population nach verschiedenen Zeitpunkten (●) und dem daraus resultierenden prozentualen Bindungsanteil zwischen ZZ-Domäne und VHH-Fc (■) im Vergleich zur initialen Messung (Abb. 4.24 B)

Aus Abb. 4.27 wird deutlich, dass über den analysierten Zeitraum die mittlere rel. Fluoreszenz der Mischung abnimmt. Zum initialen Zeitpunkt der Mischung betrug die mittlere relative Fluoreszenzintensität 152,2. Nach 32 Stunden Lagerung bei 4 °C im Dunkeln wurde ein Wert von 111,3 ermittelt. Das entsprach einer Abnahme der Signalstärke von 26,9%. Dieser Verlust wurde entweder durch die Dissoziation des VHH-Fc Fusionsproteins von der ZZ-Domäne, der Dissoziation des biotinylierten Antigens hsEGFR von der VHH-Domäne oder durch das Ausbleichen des Fluorophors verursacht. Da es sich bei der Bindung zwischen Avidin und Biotin um eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen handelt<sup>146</sup>, konnte dieser Umstand jedoch ausgeschlossen werden und da die Proben unter Lichtausschluss gelagert wurden, wurde davon ausgegangen, dass ein Ausbleichen des Fluorophors zu vernachlässigen war. Dementsprechend wurde die Abnahme der Signalstärke hauptsächlich durch die Dissoziation der VHH-Fc Fusionsproteine von der ZZ-Domäne und der Dissoziation des VHH:hsEGFR Komplexes bestimmt.

Es kann festgehalten werden, dass die Stabilität der Bindung zwischen der ZZ-Domäne und dem VHH-Fc Fusionsprotein für die Anforderungen an das Verfahren ausreichend war, da sie über einen ausreichenden Zeitraum stabil nachgewiesen werden konnte. Zur weiteren Untersuchung der Stabilität der Genotyp-Phänotyp-Kopplung wurden weitere Mischungsexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in den Kapiteln 4.15 bis 4.17 dargestellt.

#### 4.14 Oberflächenpräsentation verschiedener VHH-Fc Fusionsproteine

Zur weiteren experimentellen Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen wurde im folgenden Experiment untersucht, ob drei verschiedene für hsEGFR-spezifische VHH-Domänen auf Hefezellen präsentiert werden konnten und ob die ermittelten Signalstärken für die Antigen-Bindung mit zuvor ermittelten  $K_D$ -Werten der biomolekularen Interaktion zwischen VHH und hsEGFR korrelierten. Die Bestimmung Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ( $K_D$ ) der einzelnen VHH-Domänen erfolgte mittels Biolayer-Interferometrie (Kapitel 3.2.8). Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen VHH-Domänen löslich in Hefe-Expressionskulturen produziert und die jeweiligen Überstände der Expressionskulturen für die Bestimmung der  $K_D$  verwendet. Für das VHH-Fc Protein A (VHH-A) wurde ein  $K_D$ -Wert von 11 nM, für VHH-Fc Protein B (VHH-B) ein  $K_D$ -Wert von 23 nM und für das VHH-Fc Protein C (VHH-C) ein  $K_D$ -Wert von 5 nM gemessen (Abb. 4.28). Zur Herstellung der verschiedenen Expressionsvektoren wurde die Sequenz der VHH-Domäne A (*pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc*) mittels homologer Rekombination jeweils mit den Sequenzen der VHH-Domänen VHH-B und VHH-C substituiert. Dazu wurden die Domänen unter Verwendung von spezifischen Oligodesoxyribonukleotiden (*pYD VHHB up/rp* und *pYD VHHC up/rp*) (Kapitel 2.6) aus intern zu Verfügung gestellten pTT5-basierten Expressionsplasmiden amplifiziert und in das mittels *EcoRI* und *SacII* linearisierte Plasmid *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* kloniert. Die Klonierung erfolgte wie in Kapitel 3.1.12 erläutert.

Anschließend wurden elektrokompente EBY100 Zellen mit den Plasmiden zur löslichen Sekretion der verschiedenen VHH-Fc Fusionsproteine (*pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc*, *pYD-pGal1-app8-VHHB-Fc* und *pYD-pGal1-app8-VHHC-Fc*) und dem Plasmid für die ZZ-Domäne transformiert (Kapitel 3.1.7.2) und drei separate Expressionskulturen hergestellt. Die Expression wurde für 48 Stunden unter den üblichen Bedingungen durchgeführt (Kapitel 3.1.11). Im Anschluss wurden  $1 \times 10^7$  Zellen jeder Kultur entnommen und mit verschiedenen Konzentrationen von b-hsEGFR markiert. Hierzu wurde b-hsEGFR in den Konzentrationen 200 nM, 150 nM, 100 nM, 20 nM, 10 nM, 1 nM und 0,1 nM zur Markierung der Zellen verwendet. Zusätzlich wurden die Zellen mit SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) markiert. Als Negativkontrollen wurden die Proben ohne b-hsEGFR markiert. Die Proben wurden anschließend im Durchflusszytometer Guava easyCyte HT 2L analysiert. In Abb. 4.28 sind exemplarisch die Ergebnisse der Messungen der Oberflächen-präsentation der verschiedenen VHH-Fc Fusionsproteine gezeigt, die mit 100 nM b-hsEGFR und SA-PE markiert wurden. Zur Normalisierung der Oberflächenpräsentation



wurde die Markerregion M1 definiert und die mittlere relative Fluoreszenzintensität dieser Populationen gegen die verwendeten hEGFR Konzentrationen aufgetragen. In Abb. 4.29 sind diese Ergebnisse dargestellt. In Abb. 4.28 sind zusätzlich die zuvor durchgeführten Biolayer-Interferometrie Messungen zur Bestimmung der  $K_D$ -Wert gezeigt. Tab. 4.3 zeigt die ermittelten kinetischen Konstanten der VHH:hsEGFR-Interaktion.

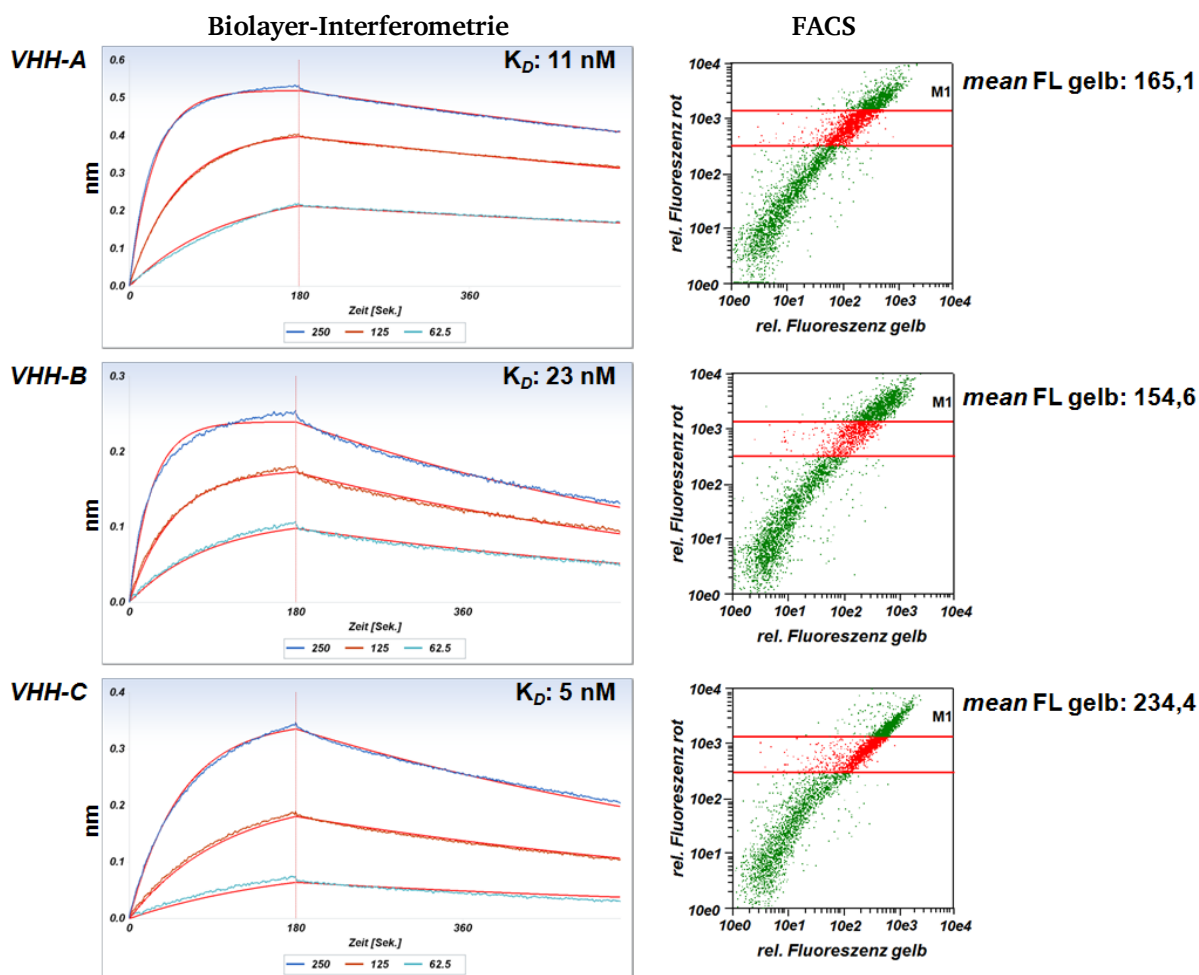
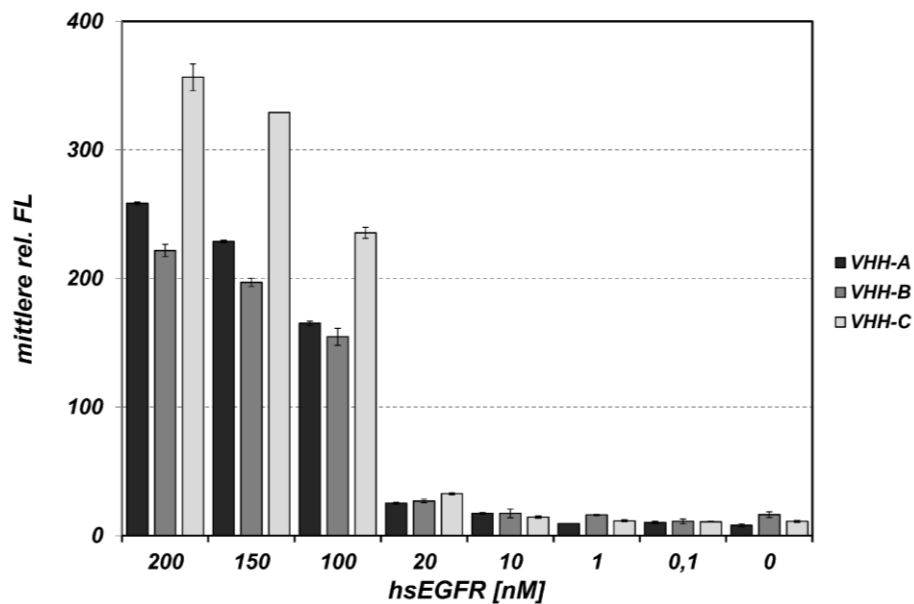


Abb. 4.28: Octet- und FACS-Analysen der Bindung versch. VHH-Fc Fusionsproteine und hsEGFR.

Analysiert wurden die biomolekularen Interaktionen der drei VHH-Domänen (VHH-A, VHH-B, VHH-C) mit dem Antigen (hsEGFR) mittels Biolayer-Interferometrie und FACS. Mean FL gelb (rel. Fluoreszenz gelb) gibt die mittlere relative Fluoreszenzintensität der in M1 lokalisierten Zellen der FACS-Messung (FACS) wieder. In der Spalte Biolayer-Interferometrie sind die prozessierten Messwerte von Assoziation und Dissoziation der Interaktion der VHH-Domänen mit löslichem Antigen (250 nM, 125 nM und 62,5 nM hEGFR) gezeigt.

Tab. 4.3: Kinetische Konstanten der Bindung der VHH-Fc Fusionsproteine (A, B, C) an hsEGFR.

	$k_a$ (1/Ms)	$k_a$ error	$k_d$ (1/s)	$k_d$ error	$K_D$ (M)
VHH-A	$1,55 \times 10^5$	$1,02 \times 10^3$	$1,83 \times 10^{-3}$	$7,29 \times 10^{-6}$	$1,18 \times 10^{-8}$
VHH-B	$6,51 \times 10^4$	$4,62 \times 10^2$	$1,50 \times 10^{-3}$	$7,06 \times 10^{-6}$	$2,31 \times 10^{-8}$
VHH-C	$1,48 \times 10^5$	$4,18 \times 10^2$	$6,98 \times 10^{-4}$	$2,73 \times 10^{-6}$	$4,74 \times 10^{-9}$



**Abb. 4.29:** Graphische Darstellung der FACS-Analyse der Bindung verschiedener VHH-Fc Fusionsproteine (A, B, C) an das Antigen hEGFR.

Mittlere rel. Fluoreszenzsignale für die Bindung von hEGFR von drei VHH-Domänen (VHH-A, VHH-B, VHH-C), die als Fc-Fusion auf EBY100 Zellen über die Interaktion mit der ZZ-Domäne präsentiert wurden. Jeweils gleiche Zellzahlen wurden mit verschiedenen hEGFR-Konzentrationen (200 nM bis 0 nM) und SA-PE markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Normalisierung des Signals der Oberflächenpräsentation wurden die Fluoreszenzsignale gegen die Konzentrationen aufgetragen. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Messungen.

Die Unterschiede der  $K_D$ -Werte der verschiedenen VHH-Domänen für das Antigen hEGFR spiegeln sich auch im Falle der Oberflächenpräsentation der VHH-Domänen als Fc-Fusion, vermittelt durch die ZZ-Domäne, wider (Abb. 4.29). In einem Konzentrationsbereich von 200 bis 20 nM ließen sich bei den Oberflächen-präsentierten Proteinen unterschiedliche mittlere relative Fluoreszenzintensitäten detektieren. VHH-C zeigte, markiert mit der gleichen Menge Antigen, ein stärkeres relatives Fluoreszenzsignal als VHH-A und VHH-B. Dieser Befund ließ sich durch den Vergleich mit den zuvor ermittelten  $K_D$ -Werten bestätigen. Dieses Experiment verdeutlichte die Leistungsfähigkeit des Systems, denn selbst geringe  $K_D$ -Unterschiede (5 nM und 11 nM) ließen sich in der FACS-Analyse reproduzieren.

#### 4.15 Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Zur experimentellen Untersuchung der Stabilität der Genotyp-Phänotyp-Kopplung des Systems der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation wurden verschiedene Mischungsexperimente durchgeführt<sup>147</sup>. Zu diesem Zweck wurden Zielzellen in einem hohen Überschuss an Kontrollzellen verdünnt und diese anschließend in aufeinander folgenden Zyklen magnetischer (MACS) und Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (FACS) angereichert. Der Mechanismus der Anreicherung basierte auf der Detektion biomolekularer Interaktionen. Durch das Mischen von Ziel- und Kontrollzellen wurde eine Art Modell-Bibliothek generiert, die eine gewisse Diversität durch die hohe Verdünnung einer spezifischen Zellpopulation widerspiegelte. Es wurden zwei verschiedene Mischungsexperimente durchgeführt, die im Folgenden erläutert werden.

Zur Herstellung der Mischungen erfolgte die Berechnung der Zellzahlen unter der Annahme, dass die optische Dichte ( $\lambda_{600}$ ) einer Hefekultur von  $1 = 1 \times 10^7$  Zellen entsprachen<sup>137</sup>.

#### 4.16 Mischungsexperiment 1

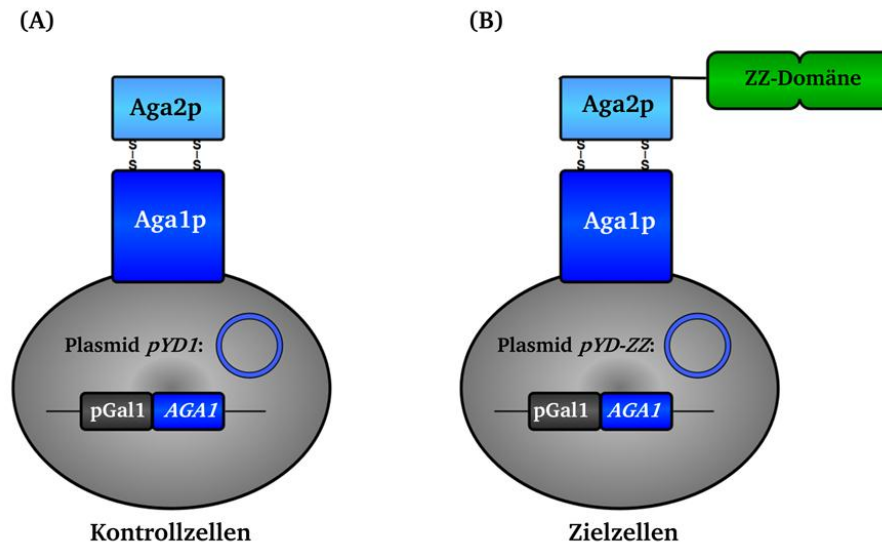
Bei den Zielzellen handelte es sich um EBY100 Transformanten, die die ZZ-Domäne auf der Oberfläche präsentierten. Sie wurden mit Anteilen von 0,001% (1:100.000) und 0,0001% (1:1.000.000) in einem großen Überschuss an Kontrollzellen verdünnt. Die eingesetzten Zellzahlen von Kontroll- und Zielzellen sind nachfolgend in Tab. 4.4 aufgeführt.

Tab. 4.4: Mischungsverhältnisse im Mischungsexperiment 1.

Gehalt Zielzellen	Anzahl Kontrollzellen	Anzahl Zielzellen	Gesamtzellzahl
0,0001%	$1 \times 10^{10}$	10.000	$\sim 1 \times 10^{10}$
0,001%	$4,5 \times 10^9$	45.000	$\sim 4,5 \times 10^9$

Bei den Kontrollzellen handelte es sich um EBY100 Transformanten, die nicht die ZZ-Domäne, sondern auf Grund ihrer Transformation mit dem Plasmid *pYD1* lediglich das Adhäsionsprotein  $\alpha$ -Agglutinin präsentierten. Abb. 4.30 zeigt schematisch den experimentellen Ansatz der Mischung. Zur Expression wurden separat 100 ml Galaktosehaltiges SD-Medium mit  $5 \times 10^8$  Zellen (Ziel- und Kontrollzellen) inokuliert und 48 Stunden kultiviert (Kapitel 3.1.13). In diesem Fall erfolgte die Kultivierung ohne PEG8000. Im Anschluss erfolgte das Mischen von Ziel- und Kontrollzellen zur Herstellung der genannten Verdünnungen und die Markierung der Zielzellen. Durch externe Zugabe eines Modell-IgG-

Moleküls (Cetuximab) wurden die Zielzellen innerhalb der Mischung markiert. Die Anreicherung mittels MACS erfolgte über die Interaktion von Cetuximab mit biotinyliertem hEGFR und Streptavidin-konjugierten magnetischen Partikeln (Miltenyi Biotech GmbH).



**Abb. 4. 30: Experimenteller Ansatz zum Mischungsexperiment 1.**

Schematisch gezeigt sind die zur Herstellung der Mischungen verwendeten Kontrollzellen (A) und Zielzellen (B). Als Kontrollzellen wurden *pYD1*-Transformanten verwendet, die das Adhäsionsprotein a-Agglutinin präsentieren. Als Zielzellen wurden *pYD-ZZ* Transformanten verwendet, die die ZZ-Domäne als Fusionsprotein mit der Untereinheit Aga2p präsentieren. In beiden Fällen erfolgte die Überexpression von AGA1 und AGA2 durch den Galaktose-induzierbaren Gal1-Promotor.

#### 4.16.1 Anreicherung von Zielzellen mittels MACS

Die initiale Anreicherung der Zielzellen erfolgte mittels MACS (*magnetic-activated cell sorting*) (Kapitel 3.1.16). Zur Berechnung der Anreicherung wurden im Vorfeld geeignete Verdünnungen der Mischungen hergestellt, auf Selektivagarplatten ausplattiert und inkubiert. Zur Markierung der Zielzellen wurden die hergestellten Mischungen mit Cetuximab, b-hsEGFR und Streptavidin-konjugierten magnetischen Partikeln inkubiert. Beide Mischungen wurden anschließend gewaschen und final in 100 ml (0,0001%) und 50 ml (0,001%) PBS resuspendiert. Die Durchführung der Magnetisch-aktivierten Zellsortierung erfolgte unter Verwendung von LS-Säulen und dem MACS Separator (Miltenyi Biotech GmbH). Die Elution erfolgte mit 4 ml PBS. Das Eluat beider Ansätze wurde anschließend zur Herstellung von Verdünnungen verwendet, die auf geeigneten Selektivagarplatten ausgestrichen und inkubiert wurden. Die Anzahl der angewachsenen Kolonien ergaben durch den Vergleich mit den vorher angefertigten Verdünnungsplattierungen Aufschluss über die erzielte maximale

Anreicherung der Zielzellen. Der Rest des Eluats wurde in 400 ml geeignetes Glukose-haltiges SD-Medium überführt und für 48 Stunden inkubiert. Nach Anzucht der Mischungen wurden erneut Expressionskulturen hergestellt um die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne auf den Zielzellen zu induzieren. Hierfür wurden je  $5 \times 10^8$  Zellen in 100 ml Galaktose-haltigem SD-Medium resuspendiert und 48 Stunden bei 25 °C und 250 Upm im Schüttelinkubator inkubiert. Die Markierung der Zellen wurde wie bereits zuvor mit Cetuximab, biotinyliertem Antigen hEGFR und Streptavidin-konjugierten magnetischen Partikeln durchgeführt. Vor der zweiten MACS-Runde und nach der Elution wurden wiederum geeignete Verdünnungen hergestellt und auf Selektivagarplatten ausplattiert, um die Anreicherung der Zielzellen zu bestimmen. Die von der Säule eluierten Fraktionen wurden anschließend in 400 ml Glukose-haltigem SD-Medium überführt und 48 Stunden inkubiert. Die während beider MACS-Runden erreichten Anreicherungen sind in Tab. 4.5 dargestellt.

**Tab. 4.5: Gesamtzellzahlen vor und nach den einzelnen Runden der MACS-Selektion und Abreicherung von Kontrollzellen im Mischungsexperiment 1.**

Gehalt Zielzellen	1. MACS-Runde		2. MACS-Runde		Abreicherung Kontrollzellen
	vor	nach	vor	nach	
0,001%	$3,8 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$8,3 \times 10^8$	$7,7 \times 10^7$	~100 fach
0,0001%	$1 \times 10^{10}$	$8 \times 10^8$	$1 \times 10^9$	$1,7 \times 10^7$	~1000 fach

Tab. 4.5 verdeutlicht die erfolgreiche Abreicherung der nicht ZZ-präsentierenden Kontrollzellen innerhalb beider Mischungen durch zwei sequentielle MACS-Runden. In der Mischung mit 0,001% Zielzellen wurde eine ca. 100-fache, in der Mischung mit 0,0001% eine ca. 1000-fache Abreicherung der Kontrollzellen erzielt. Durch diese Abreicherung wurde die Gesamtzellzahl der Mischung verringert, was die weitere spezifische Anreicherung der ZZ-präsentierenden Zellen mittels FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) aus den Mischungen ermöglichte. Zu diesem Zweck wurden die zuvor angereicherten Mischungen erneut angezogen (Kapitel 3.1.4). Die Induktion der Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne auf den Zielzellen wurde durch die Kultivierung der Zellen in geeignetem Galaktose-haltigem SD-Medium erreicht. Hierzu wurden pro Mischung  $5 \times 10^8$  Zellen in 100 ml Galaktose-haltiges SD-Medium überführt und 48 Stunden kultiviert (Kapitel 3.1.13).

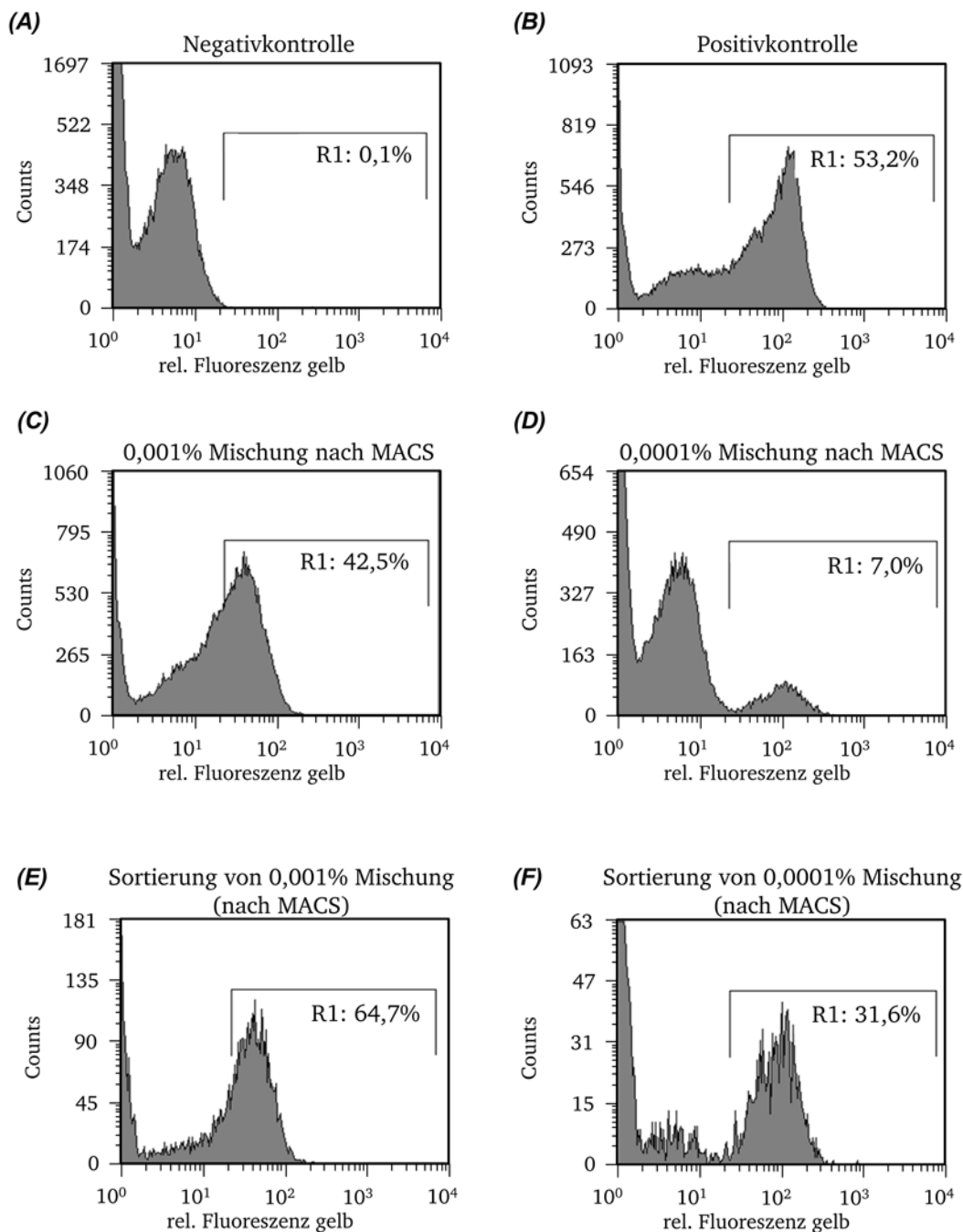
---

#### 4.16.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

---

Die ZZ-präsentierenden Zielzellen wurden im folgenden Schritt mittels FACS (Kapitel 3.1.15) innerhalb der Mischung weiter angereichert. In diesem Schritt erfolgte die Markierung der Zellen nicht mit magnetischen Partikeln, sondern mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Zu diesem Zweck wurden die Zielzellen wie gewohnt über die Bindung von Cetuximab an die Oberflächen-präsentierte ZZ-Domäne und die anschließende Bindung an das biotinylierte Antigen hsEGFR (b-hsEGFR) markiert. Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte im Anschluss durch die Bindung von SA-PE an das biotinylierte Antigen und ermöglichte die Separation von den nicht Fluoreszenz-markierten Kontrollzellen. Zu diesem Zweck wurden nach Abschluss der Expression  $1 \times 10^8$  Zellen (initiale Mischung: 0,0001%) und  $4 \times 10^7$  Zellen (initiale Mischung: 0,001%) unter den üblichen Bedingungen sequentiell mit Cetuximab, b-hsEGFR und SA-PE (Kapitel 3.1.15) innerhalb der Mischungen markiert. Die Proben wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert und Fluoreszenz-markierte Zielzellen mittels MoFlo<sup>®</sup> Zytometer über eine definierte Markerregion (R1) mithilfe der CyClone<sup>®</sup> Sortiereinheit in ein mit PBS befülltes Auffanggefäß sortiert.

Die Markerregion wurde unter Verwendung zweier Kontrollen definiert. Als Positivkontrolle dienten EBY100 Zellen, die die ZZ-Domäne auf ihrer Oberfläche präsentierten (Abb. 4.31 B). Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die die ZZ-Domäne nicht präsentierten (Abb. 4.31 A). Positiv- und Negativkontrolle wurden in gleicher Weise wie die Zellmischungen markiert. Die sortierten Zellen wurden unter Beibehaltung der Markerregion (R1) resortiert und mittels CyClone<sup>®</sup> auf geeigneten Selektivagarplatten vereinzelt. In Abb. 4.31 sind die FACS-Histogramme der Analysen beider Mischungen, sowie die Analysen von Positiv- und Negativkontrolle gezeigt.



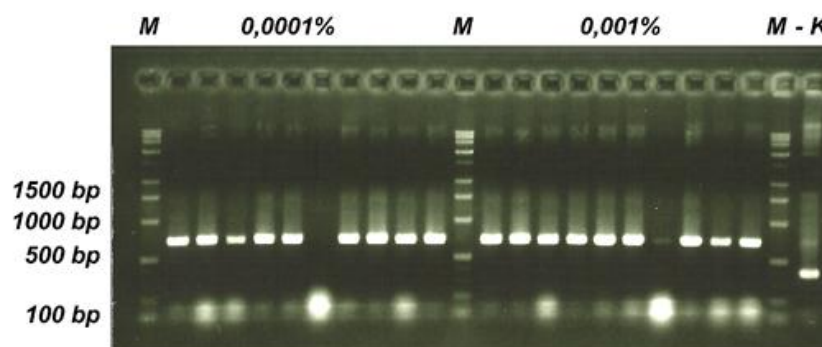
**Abb. 4.31: FACS-Analyse und Sortierung nach zwei MACS-Runden (Mischungsexperiment 1).**

FACS-Histogramme der Mischungen 0,001% und der Mischung 0,0001%. Gezeigt sind jeweils 50.000 Ereignisse (**A-D**). (**A**) Negativkontrolle: Aga2p-Kassette, (**B**) Positivkontrolle: ZZ-Domäne. (**C**) Messung der Mischung 0,001% vor der Sortierung über R1. (**D**) Messung der Mischung 0,0001% vor der Sortierung über R1. (**E**) Messung, der in der ersten Runde mittels R1 sortierten Zellen der Mischung 0,001% (3233 Ereignisse) und Übertragung der in R1 lokalisierten Zellen auf Selektivagarplatten. (**F**) Messung der in der ersten Runde mittels R1 sortierten Zellen 0,0001% (819 Ereignisse) und Übertragung der in R1 lokalisierten Zellen auf Selektivagarplatten.



Die Analysen der Negativkontrolle (Abb. 4.31 A) und der Positivkontrolle (Abb. 4.31 B) dienten zur Definition der Markerregion (R1). Über diese Region erfolgte im Anschluss die Vereinzelung der Zielzellen während der Resortierung. Im FACS-Histogramm der Positivkontrolle (Abb. 4.31 B) wurden 53,2% der Zellen mit Cetuximab, b-hsEGFR und SA-PE markiert. Diese Zellen zeigten eine signifikant stärkere Fluoreszenz-intensität als die Zellen der Negativkontrolle. In Abb. 4.31 C und D sind die FACS-Histogramme der 0,001% und 0,0001% Mischung aus der vorausgegangenen MACS gezeigt. Hier war bereits eine deutliche Anreicherung der Zielzellen zu erkennen. Die initiale 0,001% Mischung enthielt nach zwei MACS-Runden bereits 42,5% Zellen, die die ZZ-Domäne präsentierten (Abb. 4.31 C).

Die initiale 0,0001% Mischung enthielt nach der MACS 7,0% Zellen die die ZZ-Domäne präsentierten (Abb. 4.31 D). Nach der Sortierung über die Markerregion (R1) wurde eine Anreicherung auf 64,7% für die 0,001% Mischung (Abb. 4.31 E) und 31,6% für die 0,0001% Mischung (Abb. 4.31 F) gemessen. Es schloss sich eine Resortierung der Zellen innerhalb der Markerregion an. Ausgehend von dieser Resortierung erfolgte die Vereinzelung der Zellen auf geeigneten Selektivagarplatten. Diese wurden anschließend drei Tage bei 30 °C inkubiert. Jeweils 10 Klone wurden zur Anzucht in Flüssigmedium inokuliert und kultiviert (Kapitel 3.1.4). Anschließend wurden die Kulturen zur Plasmidisolierung verwendet (Kapitel 3.1.10). Die Plasmide wurden in einer PCR (Kapitel 3.3.4), die mit den Oligodesoxyribonukleotiden *pYD-mcs-up* und *pYD-mcs-rp* durchgeführt wurde, als Matrize eingesetzt. Bei den Kontrollzellen ergab sich ein PCR-Produkt mit einer Größe von 393 bp; bei den Zielzellen ergab sich ein PCR-Produkt mit einer Größe von 697 bp. Die Größen der PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert (Kapitel 3.3.7). Die Ergebnisse sind in Abb. 4.32 dargestellt.



**Abb. 4.32: Analyse der sortierten Klone aus Mischungsexperiment 1.**

Agarosegelelektrophorese der PCR von jeweils zehn mittels FACS isolierten Klonen der Mischungen 0,0001% und 0,001% nach zwei MACS-Runden. Die PCR wurde mit *pYD1*-spezifischen Oligodesoxyribonukleotiden. Positive Klone zeigen ein PCR-Produkt mit einer Größe von 697 bp. Negativkontrolle (-K): PCR-Produkt (393 bp) unter Verwendung des *pYD1*-Plasmids als Matrize für die PCR.



Mittels Analyse der PCR-Produkte konnten die vereinzelt Zellen den Zielzellen zugeordnet werden. Aus beiden Mischungen wurden *pYD-ZZ* Plasmide mittels spezifischer Oligodesoxyribonukleotide identifiziert. Aus der Mischung mit einem initialen Gehalt von 0,0001% Zielzellen wurde über zwei MACS-Runden und eine FACS-Runde eine 90%ige (9 von 10) Anreicherung der Zielzelle erreicht. Aus der Mischung mit einem initialen Gehalt von 0,001% Zielzellen wurden über zwei MACS-Runden und eine FACS-Runde eine 100%ige (10 von 10) Anreicherung der Zielzelle erreicht. Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse des zweiten Mischungsexperimentes gezeigt.

---

#### 4.17 Mischungsexperiment 2

---

In einem weiteren Mischungsexperiment wurde die Komplexität der zu trennenden Zellmischung erhöht, um die Leistungsfähigkeit des Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen eingehender zu untersuchen. Es wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, in welchem die Anreicherung und Separation der Zielzellen durch die Spezifität des Oberflächen-präsentierten VHH-Fc Fusionsproteins erfolgte. Die Zellpopulationen von Ziel- und Kontrollzellen präsentierten beide VHH-Fc Fusionsproteine mit unterschiedlicher Spezifität. Die Zielzellen präsentierten das hsEGFR-spezifische (*pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc*), die Kontrollzellen ein Thioredoxin-spezifisches (*pYD-pGal1-app8-VHH2-Fc*) VHH-Fc Fusionsprotein.

Die Markierung der stark verdünnten Zielzellen erfolgte durch die Bindung der VHH-Domäne an das biotinylierte Antigen hsEGFR. Durch die Herstellung der Zellmischungen im Vorfeld der Genexpression wurde die Komplexität des Experimentes gegenüber Kapitel 4.16 weiterhin gesteigert. Ziel- und Kontrollzellen wurden in definierten Verhältnissen gemischt. Es wurden zwei Mischungen mit 0,001% (1:100.000) bzw. 0,0001% (1:1.000.000) Zielzellen hergestellt. Mittels MACS und FACS wurden die hsEGFR-spezifischen VHH-Fc präsentierenden EBY100 Zellen aus dem Überschuss an Kontrollzellen zurückgewonnen.

Im Anschluss an die Transformation und Selektion wurden, ausgehend von den Vorkulturen von Kontroll- und Zielzellen, Mischungen hergestellt. Für die Mischung mit 0,0001% Zielzellen wurden  $2 \times 10^8$  Kontrollzellen mit ca. 200 Zielzellen in Galaktose-haltigem SD-Medium + PEG8000 resuspendiert. Für die Mischung mit 0,001% Zielzellen wurden  $2 \times 10^8$  Kontrollzellen mit ca. 2000 Zielzellen in Galaktose-haltigem SD-Medium + PEG8000 resuspendiert. Beide Mischungen wurden anschließend in Petrischalen überführt und 48 Stunden bei 20 °C ohne Schütteln zur Genexpression inkubiert.

#### 4.17.1 Anreicherung von Zielzellen mittels MACS

Im Anschluss an die Induktion der Oberflächenpräsentation wurden  $1 \times 10^9$  Zellen der Mischungen pelletiert und unter den üblichen Bedingungen mit biotinyliertem hEGFR und Streptavidin-gekoppelten magnetischen Partikeln (Miltenyi Biotech GmbH) markiert (Kapitel 3.1.16). Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in 50 ml PBS resuspendiert. Die magnetisch-aktivierte Zellsortierung wurde mit LS Säulen im MACS Separator (Miltenyi Biotech GmbH) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 4 ml PBS. Das Eluat wurde anschließend zur Herstellung von Verdünnungen verwendet, die auf geeigneten Selektivagarplatten ausgestrichen und inkubiert wurden. Die Anzahl der angewachsenen Kolonien gaben durch den Vergleich mit den vorher angefertigten Verdünnungsplattierungen Aufschluss über die erzielte maximale Anreicherung (Tab. 4.6)

**Tab. 4.6: Gesamtzellzahlen vor und nach der MACS-Selektion und Abreicherung von Kontrollzellen im Mischungsexperiment 2.**

Gehalt Zielzellen	MACS-Runde		Abreicherung Kontrollzellen
	vor	nach	
0,001%	$7,3 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	~ 10 fach
0,0001%	$3 \times 10^8$	$6,3 \times 10^7$	~ 10 fach

Der Rest des Eluats wurden anschließend in 50 ml geeignetes Glukose-haltiges SD-Medium überführt und 24 Stunden kultiviert. Durch die magnetisch-aktivierte Zellsortierung erfolgte bei beiden Mischungen eine zehnfache Abreicherung der Kontrollzellen innerhalb der Mischung. Die Abreicherung wurde durch Auszählen der auf Selektivagarplatten gewachsenen Klone vor und nach der MACS bestimmt. Die in den Mischungen enthaltenen Zielzellen wurden in der nächsten Selektionsrunde mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung weiter angereichert.

#### 4.17.2 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Im Anschluss an die Vorsortierung mittels MACS wurde die VHH-Fc Genexpression der angereicherten Mischungen erneut induziert. Hierfür wurden  $2 \times 10^8$  Zellen jeder Mischung zur Herstellung von 20 ml Expressionskulturen mit Galaktose-haltigem SD-Medium +PEG8000 verwendet. Die anschließende Kultivierung erfolgte in einer Petrischale für 72 Stunden bei 20 °C (Kapitel 3.1.13). Als nächstes wurden jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen entnommen

und mit b-hsEGFR (1  $\mu$ M) und SA-PE markiert (Kapitel 3.1.15). Die Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine wurde mit einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Dylight™ 649-Konjugat) aus der Ziege nachgewiesen. Die markierten Zellen wurden anschließend im MoFlo™ Zyotmeter analysiert und positive Zielzellen über eine zuvor definierte Markerregion (R1) mittels CyClone® in ein separates Auffanggefäß sortiert. Die Markerregion wurde aufgrund der Messung der Negativkontrolle definiert. Hierbei handelte sich um Kontrollzellen, die in gleicher Weise wie die Mischungen markiert wurden. Aufgrund der fehlenden Spezifität der Oberflächen-präsentierten VHH-Domäne für das biotinylierte Antigen hsEGFR konnte in diesem Fall nur das Fc-spezifische Signal (rel. Fluoreszenz rot) detektiert werden (Abb. 4.33 E). In Abb. 4.33 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der Sortierungen gezeigt.

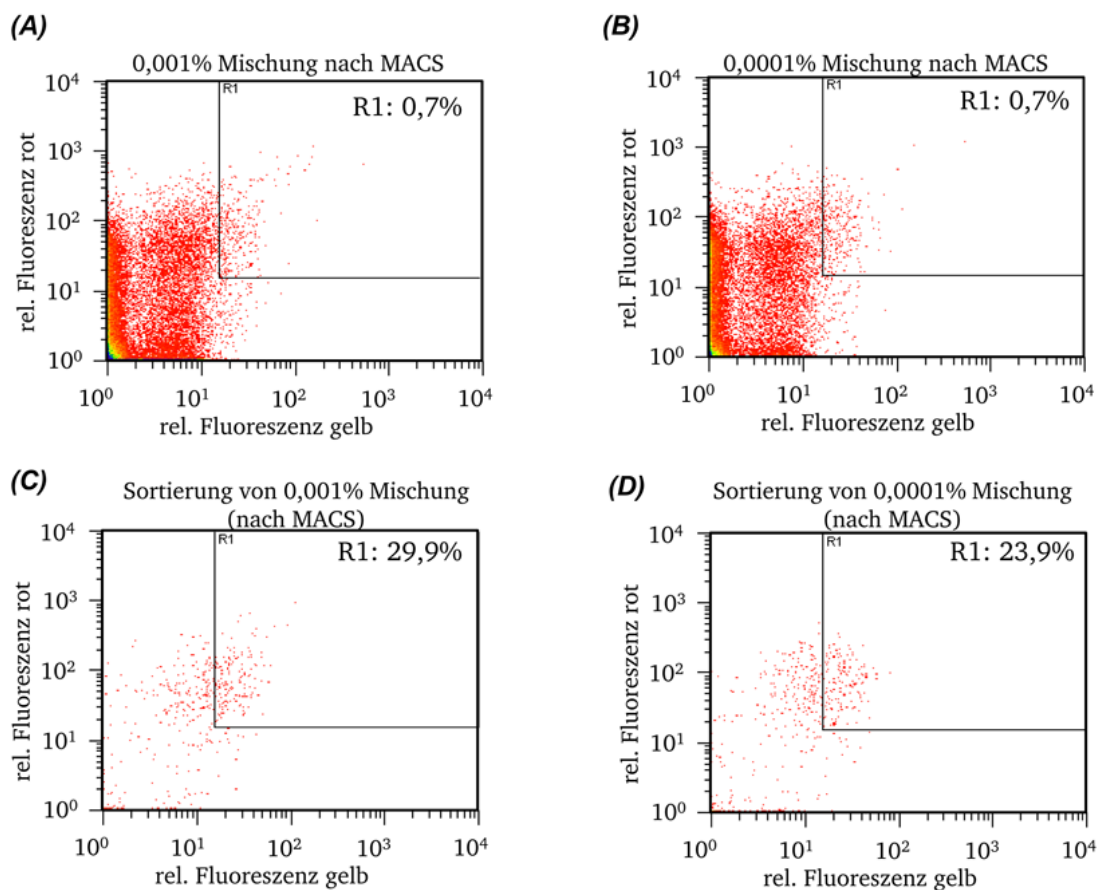
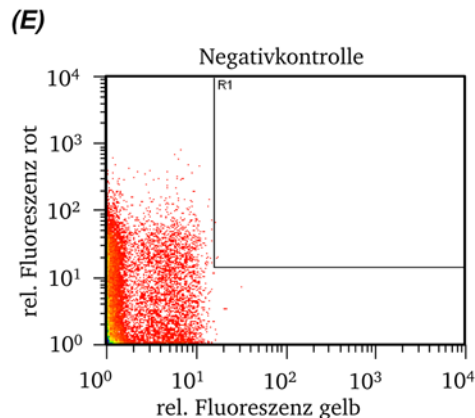


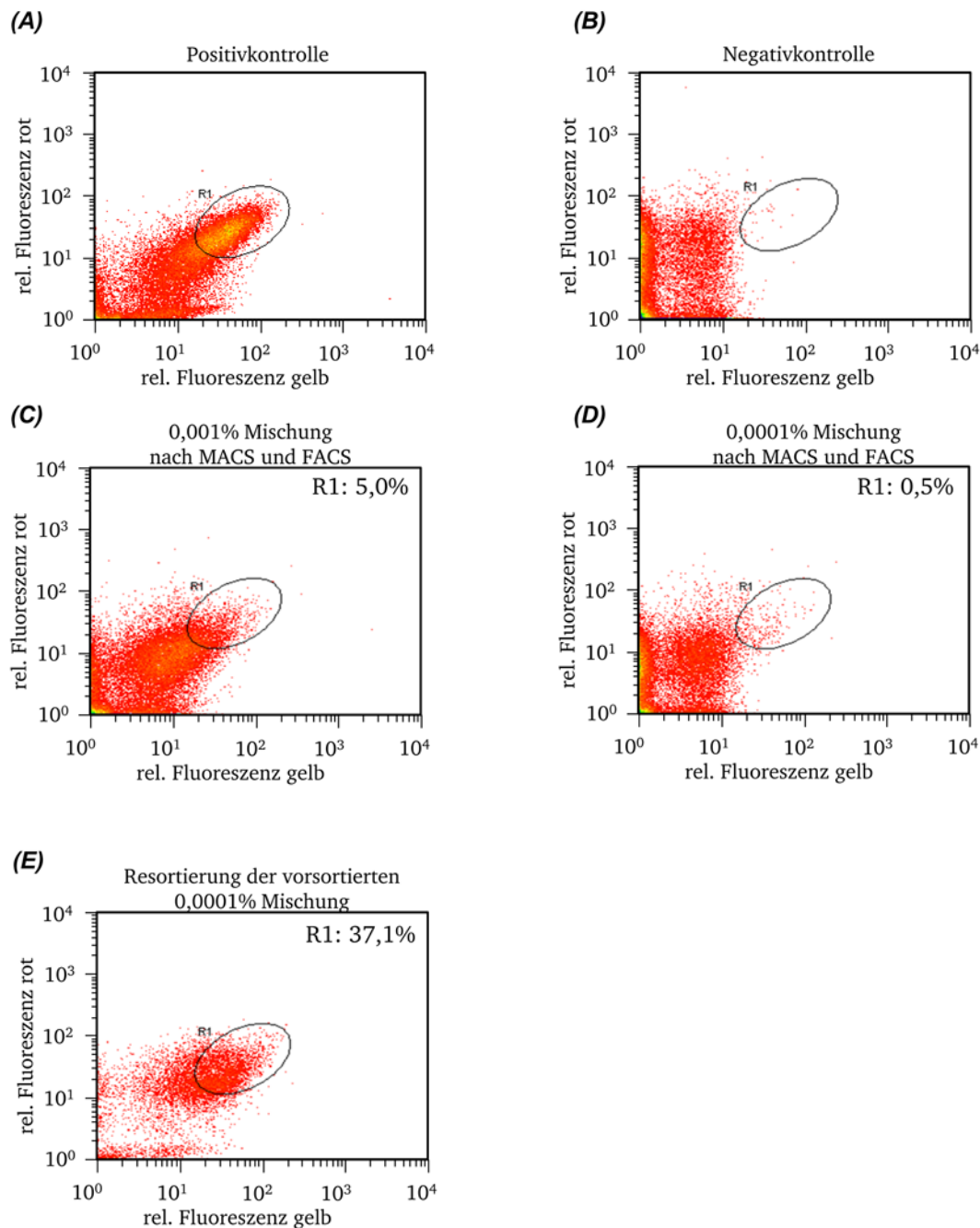
Abb. 4.33: (Fortsetzung und Beschreibung auf der folgenden Seite) 1. FACS-Analyse und Sortierung nach der MACS-Selektion (Mischungsexperiment 2).



**Abb. 4.33: 1. FACS-Analyse und Sortierung nach der MACS-Selektion (Mischungsexperiment 2).**

Sortierung von Zielzellen aus zwei Mischungen (Anteil Zielzellen: 0,001% und 0,0001%). Dargestellt sind die durchflusszytometrischen Analysen der ersten FACS-Runde nach der MACS. Über die Region R1 erfolgte die durchflusszytometrische Sortierung mittels CyClone®. **(A)** Messung von 50.000 Zellen der gefärbten Mischung (0,001%) vor der Sortierung im Durchflusszytometer (0,7% in R1). **(B)** Messung von 50.000 Zellen der gefärbten Mischung (0,0001%) vor der Sortierung im Durchflusszytometer (0,7% in R1). **(C)** Messung der sortierten Zellpopulation der Mischung 0,001% (R1 29,9%). **(D)** Messung der sortierten Zellpopulation der Mischung 0,0001% (R1 23,9%). **(E)** Negativkontrolle: Oberflächen-präsentierte VHH-Domäne ohne hsEGFR-Spezifität. Markierung mit b-hsEGFR, SA-PE und dem Fc<sub>γ</sub> Fragment-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Dylight™ 649) aus der Ziege als Kontrolle und zur Definition der Region R1. PMT FL8 (rot) & FL2 (gelb): 400.

Im Vergleich mit der Negativkontrolle (Abb. 4.33 E) war bei beiden Mischungen bereits vor der Sortierung mittels FACS ein deutlich stärkeres relatives Fluoreszenzsignal für die hsEGFR Bindung zu erkennen. In beiden Fällen konnten 0,7% der Zellen, über die Interaktion mit dem biotinylierten Antigen hsEGFR und SA-PE markiert werden (Abb. 4.33 A und B). In den FACS-Analysen aus Abb. 4.33 C und D ist die Messung der sortierten Zellfraktionen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der Anteil an Fluoreszenz-markierten Zellen in den sortierten Fraktionen auf 29,9% bzw. 23,9% angestiegen war. Die sortierten Fraktionen wurden quantitativ in 25 ml geeignetes Glukose-haltiges SD-Medium überführt 48 Stunden kultiviert (Kapitel 3.1.4). Im Anschluss an die Anzucht der sortierten Populationen wurden erneut Expressionskulturen beider Mischungen hergestellt. Hierfür wurden 20 ml Galaktose-haltiges SD-Medium +PEG8000 mit  $2 \times 10^8$  Zellen inokuliert und 48 Stunden bei 20 °C in einer Petrischale ohne Schütteln inkubiert. Nach Abschluss der Expression wurden jeweils  $1 \times 10^8$  Zellen pelletiert und unter den üblichen Bedingungen mit b-hsEGFR (1 μM), SA-PE und dem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (Dylight™ 649-Konjugat) aus der Ziege sequentiell markiert (Kapitel 3.1.15). Die markierten Zellen wurden durchflusszytometrisch untersucht und Fluoreszenz-markierte Zielzellen über eine zuvor definierte Markerregion (R1) in ein separates Auffanggefäß sortiert. In Abb. 4.34 sind die Ergebnisse der FACS-Analysen gezeigt.



**Abb. 4.34: 2. FACS-Analyse und Sortierung nach MACS - Mischungsexperiment 2.**

Wiedergewinnung von Zielzellen aus zwei Mischungen (Anteil Zielzellen: 0,001% und 0,0001%). Dargestellt sind die Histogramme der zweiten FACS-Runde. Die Region R1 wurde zur durchflusszytometrischen Sortierung mittels CyClone<sup>®</sup> verwendet. (A) Induzierter und mit 1  $\mu$ M b-hsEGFR und SA-PE markierter EBY100 Einzelklon, welcher die hsEGFR-bindende VHH-Domäne als Fc-Fusion auf der Oberfläche präsentierte. Dieser diente als Kontrolle und zur Definition der Region R1. (B) Gleicher Klon wie in (A), Markierung ohne b-hsEGFR. (C) 50.000 Zellen der Mischung 0,001%, (D) 50.000 Zellen der Mischung 0,0001%. (E) Resortierung der zuvor sortierten Mischung 0,0001% aus (D). PMT rot & gelb: 400.

---

Die Mischung mit initial 0,001% Zielzellen zeigte bereits ein deutliches hsEGFR-spezifisches Signal (Abb. 4.34 C) nach einer FACS- und einer MACS-Runde. Der prozentuale Anteil der Zellen innerhalb der Markerregion R1, die vorher durch die Messungen der Kontrollen (Abb. 4.34 A und B) festgelegt wurde, betrug 5,0%. Aus diesem Grund wurden direkt 100 Zellen mittels CyClone® über das Sort-Fenster R1 auf Selektivagarplatten vereinzelt. Die vereinzelteten Zellen wurden bei 30 °C im Inkubator vier Tage inkubiert.

Die Mischung mit initial 0,0001% Zielzellen ließ eine geringere Zellpopulation innerhalb der Markerregion R1 erkennen. Es waren 0,5% der Zellen innerhalb dieser Region lokalisiert (Abb. 4.34 D). Nach der Sortierung erfolgte aus diesem Grund eine Resortierung, wodurch sich eine Anreicherung der Zellen im Sort-Fenster auf 37,1% ergab (Abb. 4.34 E). Aus dieser Zellpopulation wurden im Anschluss mittels CyClone® 100 Zellen auf einer Selektivagarplatte vereinzelt. Die vereinzelteten Zellen wurden ebenfalls bei 30 °C im Inkubator für vier Tage inkubiert.

Nach Anzucht der Einzelklone wurden jeweils 10 Klone unter sterilen Bedingungen entnommen und zur Herstellung von Vorkulturen verwendet (Kapitel 3.1.4). Ausgehend von diesen Vorkulturen wurden im Anschluss Expressionskulturen hergestellt, um die Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine zu induzieren (Kapitel 3.1.13). Zu diesem Zweck wurden pro Kultur  $3 \times 10^7$  Zellen entnommen und in 3 ml geeignetes Galaktose-haltiges SD-Medium +PEG8000 resuspendiert und für 48 Stunden bei 20 °C inkubiert. Im Anschluss an die Expression der Oberflächenpräsentation erfolgte die Markierung der Oberflächen-präsentierten VHH-Fc Fusionsproteine mit dem zur ersten Selektion verwendeten biotinyliertem Antigen hsEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> (Dylight™ 649-Konjugat) aus der Ziege. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte wie in Kapitel 3.1.15 beschrieben. Die Analyse der Oberflächenpräsentation erfolgte durchflusszytometrisch mittels Guava easyCyte HT 2L. Durch den Vergleich der Fluoreszenzsignale der einzelnen Klone mit denen der Positivkontrolle (Abb. 4.35 B) und der Negativkontrolle (Abb. 4.35 A) konnten die Klone den Zielzellen oder den Kontrollzellen zugeordnet werden. Die Ergebnisse der hierzu sind in Abb. 4.35 und 4.36 gezeigt.

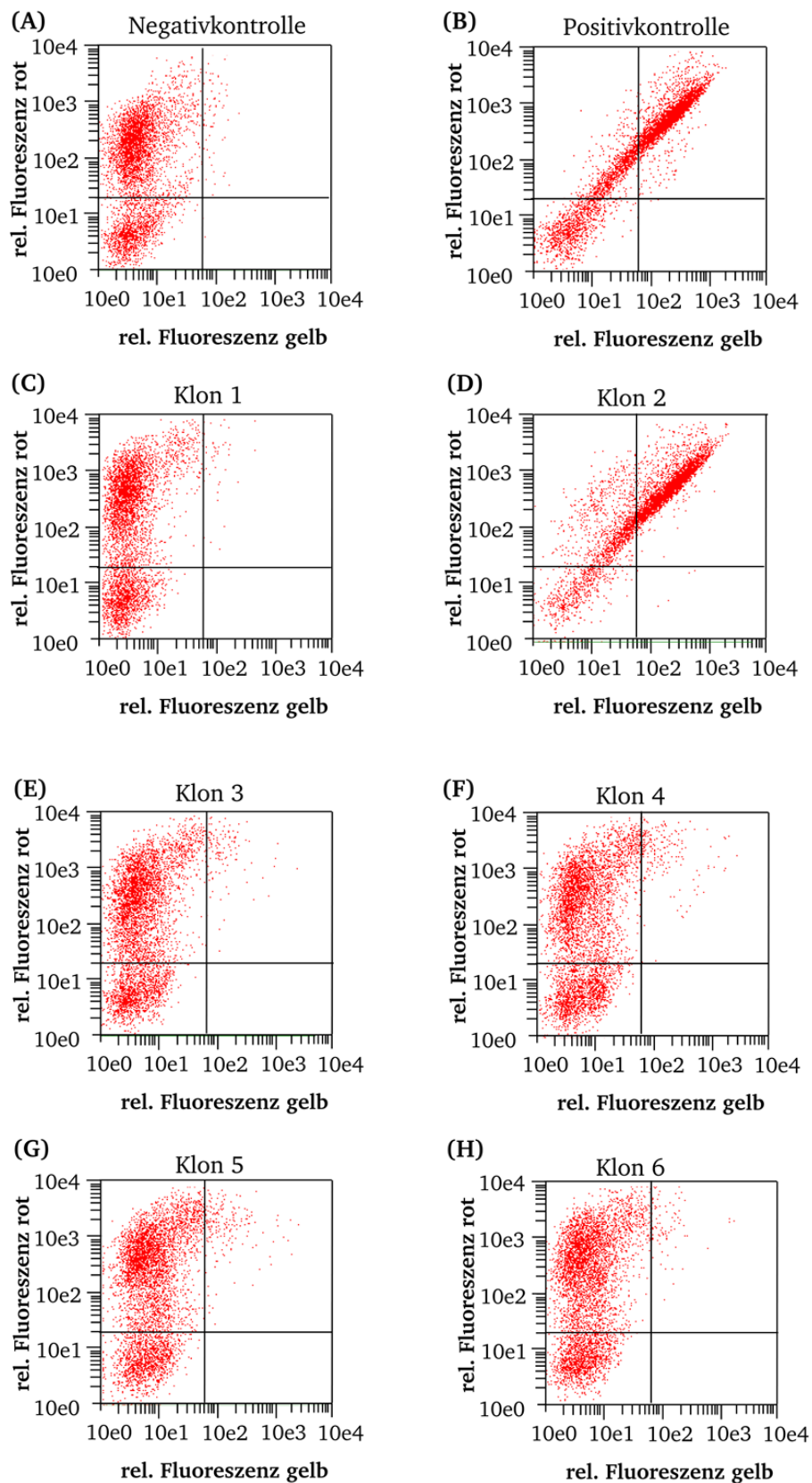
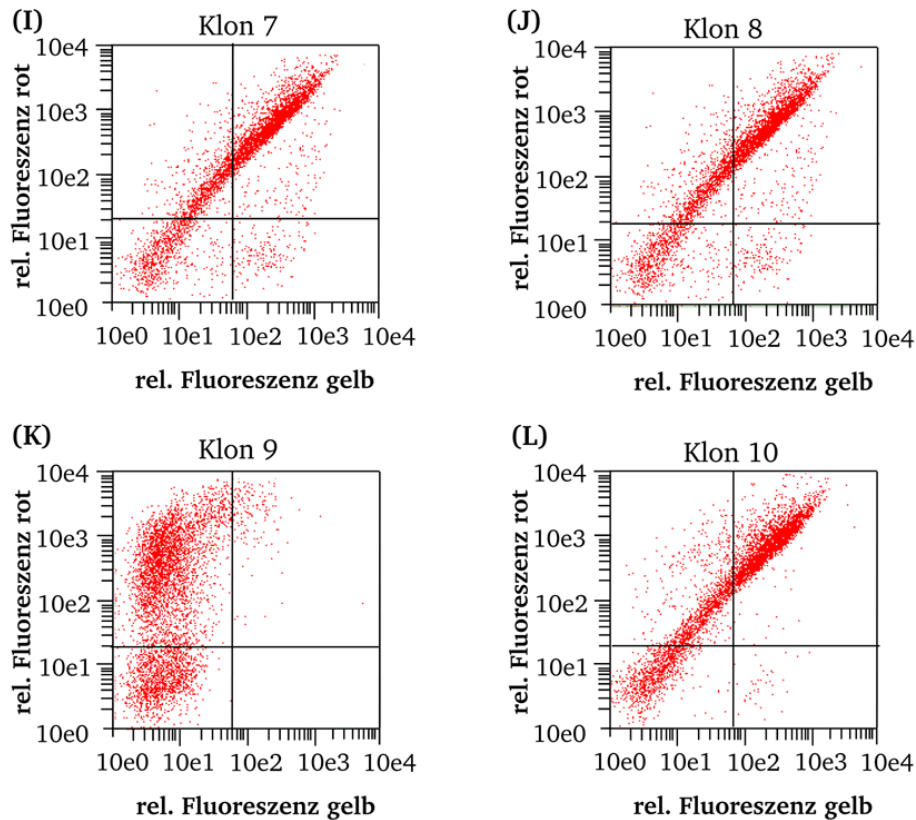


Abb. 4.35: Fortsetzung und Beschreibung auf der folgenden Seite.





**Abb. 4.35: Einzelklonanalyse der Mischung 0,001% nach MACS und FACS.**

Zwei-Farben-Markierung und FACS-Analyse von 10 selektierten Einzelklonen (*C-L*) aus der Mischung 0,001%. Positive Einzelklone wurden durch die Interaktion mit b-hsEGFR und SA-PE (Fluoreszenz gelb) auf der Zelloberfläche detektiert. Die Markierung des Fc-Teils erfolgte über einen Fc-spezifischen Antikörper aus der Ziege (Dylight™ 649-Konjugat; rote Fluoreszenz). In (*A*) ist die Positivkontrolle gezeigt mit Bindung von b-hsEGFR durch die VHH-Domäne. In (*B*) ist die Negativkontrolle gezeigt: keine b-hsEGFR Bindung (Fluoreszenz gelb) vorhanden.



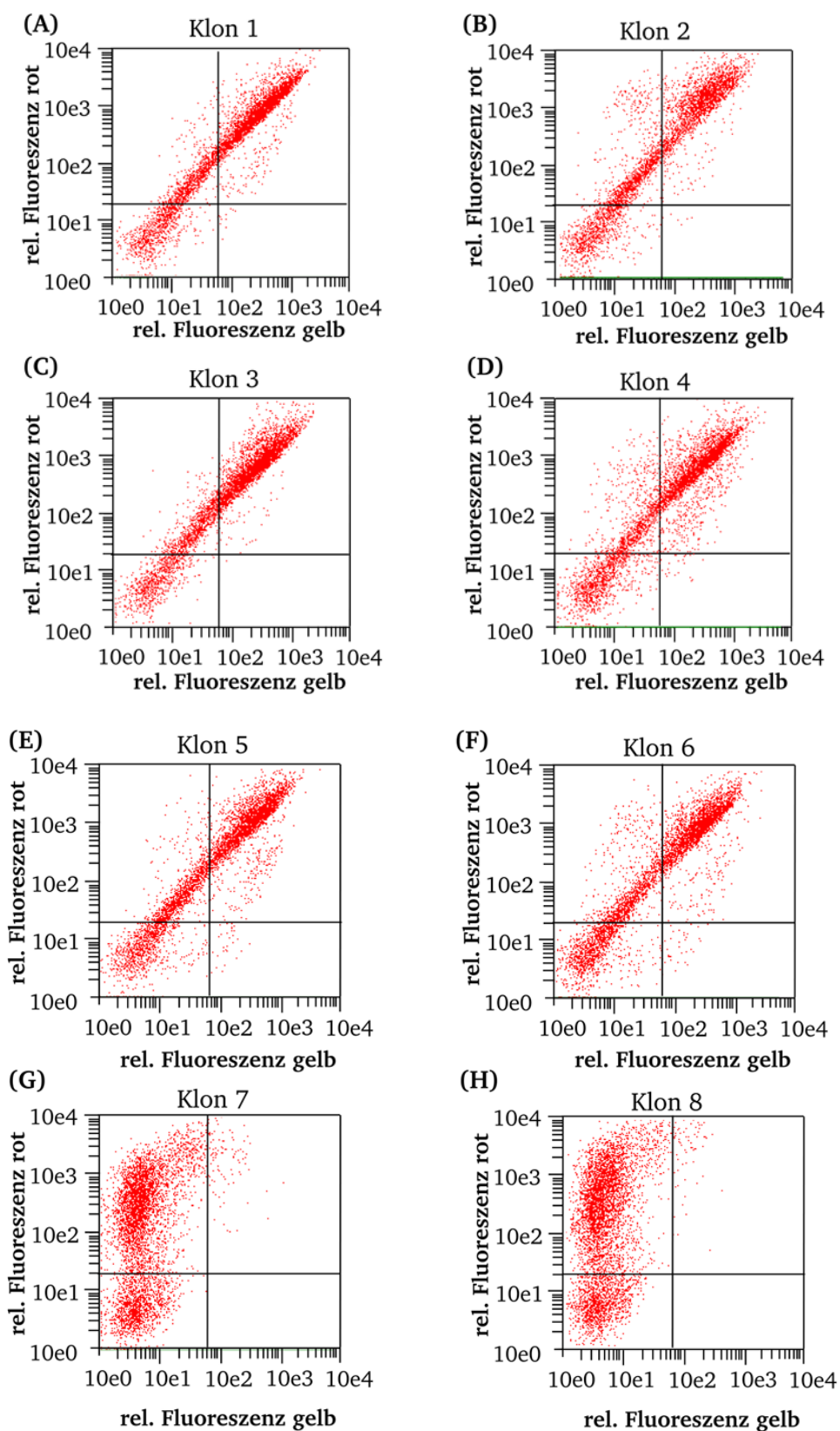
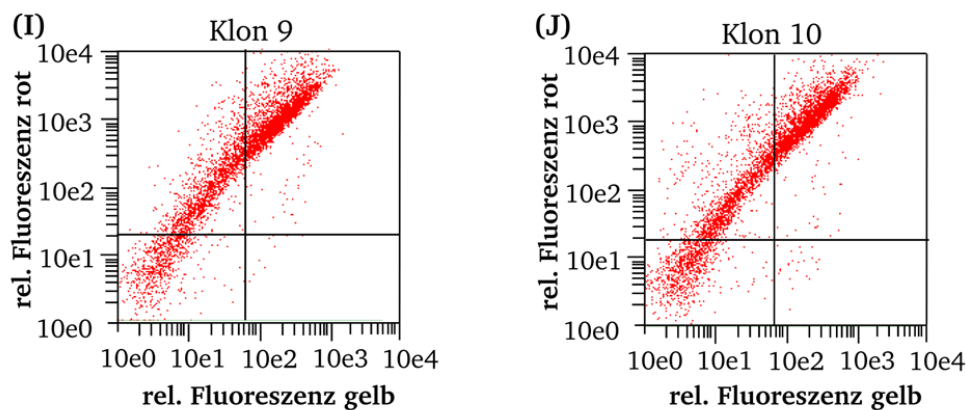


Abb. 4.36: Fortsetzung und Beschreibung auf der folgenden Seite.



**Abb. 4.36: Einzelklonanalyse der Mischung 0,0001% nach MACS und FACS.**

Zwei-Farben-Markierung und FACS-Analyse von 10 selektierten Einzelklonen (*A-J*) aus der Mischung 0,0001%. Positive Einzelklone wurden durch die Interaktion mit b-hsEGFR und SA-PE (Fluoreszenz gelb) auf der Zelloberfläche detektiert. Die Markierung des Fc-Teils erfolgte über einen Fc-spezifischen Antikörper aus der Ziege (Dylight 649™ Konjugat; rote Fluoreszenz). Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle wurden von Abb. 4.34 verwendet und sind nicht extra dargestellt.

Aus den Ergebnissen der Analyse der Oberflächen-präsentierten VHH-Fc Fusionsproteine der vereinzelt Klone (Abb. 4.35 und 4.36) konnte deren Spezifität zugeordnet werden. Die Zielzellen innerhalb der 0,001% Mischung konnten nach drei Selektionsrunden bis zu 40% angereichert werden. Vier von zehn analysierten Klonen präsentierten die hsEGFR-spezifische VHH-Domäne. Bei den analysierten Klonen der Mischung mit 0,0001% Zielzellen konnten nach drei aufeinanderfolgenden Selektionsrunden acht von zehn analysierten Klonen identifiziert werden, die die hsEGFR-spezifische VHH-Domäne auf der Zelloberfläche präsentierten und die sich aus diesem Grund mit dem Antigen spezifisch markieren ließen. Es wurde eine Anreicherung von 80% ermittelt, da ausschließlich die Zielzellen mit b-hsEGFR und SA-PE markiert werden konnten. Bei diesen ist eine deutliche Verschiebung des Fluoreszenzsignals in den rechten oberen Quadranten in der FACS-Messung zu erkennen. Die Zuordnung der Klone zu der Zellpopulation der Zielzellen wurde durch den Vergleich mit der Positivkontrolle (Abb. 4.35 A) möglich. Die Mischung mit dem geringeren Anteil an Zielzellen (0,0001%) zeigte eine Wiederfindungsrate der Zielzellen von 80%. Diese liegt deutlich über der Wiederfindungsrate von 40%, die für die Mischung mit 0,001% Zielzellen ermittelt werden konnte.

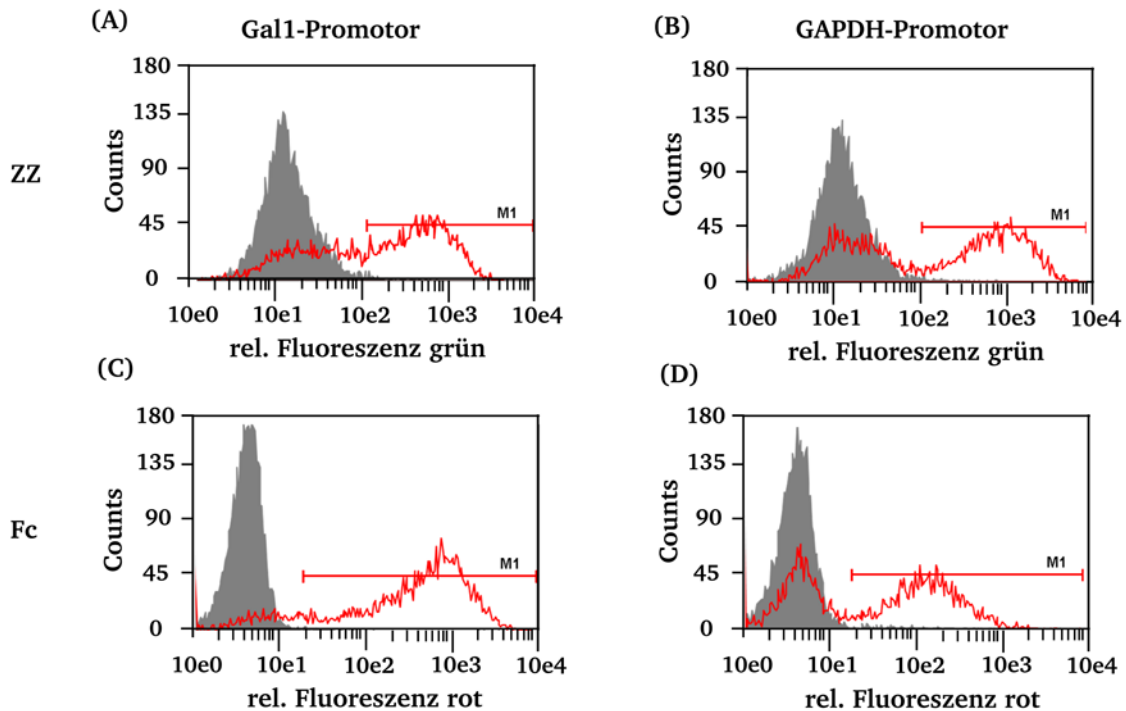
Abschließend kann festgehalten werden, dass die Ergebnisse beider Mischungsexperimente einen starken Beleg dafür lieferten, dass die Interaktion zwischen ZZ-Domäne und VHH-Fc Fusionsprotein stabil genug war, um Zielzellen aus einem großen Überschuss an Kontrollzellen durch die spezifische Bindungseigenschaft der präsentierten VHH-Domäne mittels gängiger HTS-Methoden wie MACS und FACS anzureichern und zu isolieren.

#### 4.18 Wechsel zwischen Oberflächenpräsentation und löslicher Sekretion

Mit Hilfe des Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation können selektierte Proteine zur weiteren Charakterisierung löslich hergestellt werden. Dies ist mit dem hier vorgestellten Verfahren im Gegensatz zu den herkömmlichen Verfahren ohne zeitaufwändige Zwischenschritte möglich. Bei vergleichbaren Methoden zur Oberflächenpräsentation, wie z.B. unter Verwendung der kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen als Aga2p-Fusion, war es bisher notwendig, die selektierten Klone in einen geeigneten Vektor zur löslichen Produktion des Proteins umzuklonieren. Das hier vorgestellte Verfahren liefert eine entscheidende Neuerung, indem die VHH-Fc Fusionsproteine über die Interaktion mit der ZZ-Domäne in nicht-kovalenter Weise präsentiert werden. Immanent ist dem Verfahren allerdings die Notwendigkeit der Verwendung von zwei Vektoren: ein Vektor zur Expression und kovalenten Oberflächenverankerung der ZZ-Domäne über Aga2p, ein zweiter zur löslichen Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins. Um die Vereinzelung des Plasmids für die lösliche Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins mittels Plasmidisolierung und erneuter Transformation von Hefezellen zu umgehen, wurde ein weiteres Plasmid für die schaltbare Expression und lösliche Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand hergestellt. Zu diesem Zweck wurde der induzierbare Gal1-Promotor in dem Plasmid *pYD-pGal-app8-VHH1-Fc* durch den konstitutiv exprimierenden Promotor GAPDH mittels homologer Rekombination in Hefezellen ersetzt (Kapitel 3.1.12). Die DNA-Sequenz des GAPDH-Promotors wurde mit den Oligodesoxyribonukleotiden *gapdh-pYD-up* und *gapdh-pYD-rp* (Kapitel 2.6) und dem Plasmid *pGAPZ* (Life Technologies Corp.) mittels PCR amplifiziert (Kapitel 3.3.3). Durch die Verwendung der oben genannten Oligodesoxyribonukleotide wurde ein PCR-Produkt generiert, das an seinen Enden zum Plasmid *pYD-pGal-app8-VHH1-Fc* homologe Sequenzbereiche aufwies. Zur Initiierung der homologen Rekombination in Hefezellen wurde das Plasmid mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* linearisiert (Kapitel 3.3.6). Die Überprüfung der Restriktion wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.3.7) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Im Vorfeld wurde die Erkennungssequenz für *KpnI* im Bereich der DNA-Sequenz des Gal1-Promotors im Plasmid *pYD-pGal-app8-VHH1-Fc* mittels ortsspezifischer Mutagenese (Kapitel 3.3.5.1) eingeführt. Hierfür wurden die Oligodesoxyribonukleotiden *pGal-KpnI-up* und *pGal-KpnI-rp* verwendet. Mittels Sequenzierung mit flankierenden Oligodesoxyribonukleotiden (*pYD pex up/rp*) (Kapitel 2.6) wurde die Mutagenese überprüft und bestätigt. Für die homologe Rekombination in Hefezellen wurden das mittels *KpnI* linearisierte Plasmid und das PCR-Produkt für die Sequenz des GAPDH-Promotors zur Transformation von EBY100 Zellen verwendet (Kapitel 3.1.12). Nach

Selektion, *E. coli* Transformation (Kapitel 3.1.2), Plasmidisolierung (Kapitel 3.1.3) und anschließender Sequenzierung (Kapitel 3.3.14) wurde der Klon mit der gewünschten Plasmidsequenz identifiziert. Das Plasmid *pYD-pGAPDH-app8-VHH1-Fc* mit erfolgreicher Promotorsubstitution wurde anschließend mit dem Plasmid *pYD-ZZ* zur Transformation von elektrokompenten EBY100 Zellen verwendet (Kapitel 3.1.8.1). Die schaltbare Expression wird bei diesen Doppeltransformanten über den Transfer der Zellen von Galaktose-haltigem SD-Medium in Glukose-haltiges SD-Medium erreicht, wodurch die Reprimierung des Gal1-Promotors erfolgt und die ZZ-Domäne nicht mehr exprimiert wird. Zur Kontrolle wurde das Plasmid *pYD-pGal-app8-VHH1-Fc* mit dem Plasmid *pYD-ZZ* ebenfalls zur Transformation von EBY100 Zellen verwendet. Die lösliche VHH-Fc Sekretion ist wie die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne durch den Gal1-Promotor reguliert, wodurch die lösliche Sekretion der VHH-Fc Fusionsproteine nicht über den Transfer der Zellen in Glukose-haltiges Medium möglich ist.

Nach erfolgter Selektion auf geeigneten Selektivagarplatten wurde je ein Klon zur Herstellung einer Glukose-haltigen SD-Kultur + PEG8000 verwendet (Kapitel 3.1.8.1). Im Anschluss an die Kultivierung (Kapitel 3.1.4) wurden Kulturen mit geeignetem Galaktose-haltigem SD-Medium + PEG8000 hergestellt (Kapitel 3.1.13). Das Verhalten beider Promotorpaare (pGal1/pGal1 und pGal1/pGAPDH) in Bezug auf die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domänen und der VHH-Fc Fusionsproteine ist in Abb. 4.37 gezeigt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen der Glukose-haltigen Kulturen und die Zellen der Galaktose-haltigen Kulturen mit einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) und einem Protein A-spezifischen Antikörper (FITC-Konjugat) markiert und im Durchflusszytometer Guava easyCyte HT 2L analysiert. Durch die Zwei-Farben-Markierung der Zellen mit dem Fc-spezifischen Antikörper und dem Protein A-spezifischen Antikörper konnte die Oberflächenpräsentation des VHH-Fc Fusionsproteins und der ZZ-Domäne simultan detektiert werden. Dadurch wurde die Überprüfung der Funktionsweisen der Promotoren im Durchflusszytometer ermöglicht.



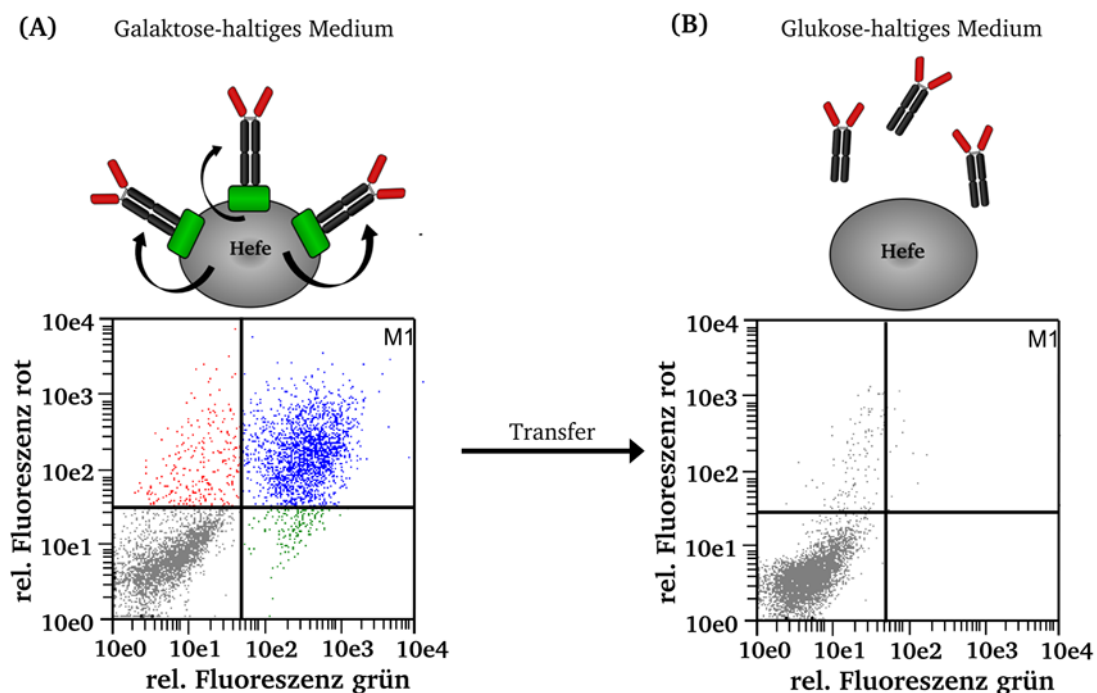
**Abb. 4.37: FACS-Analyse zur schaltbaren Oberflächenpräsentation.**

FACS-Histogramme zur Untersuchung der schaltbaren Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen. (A) und (C) *pYD-pGal-app8-VHH1-Fc/pYD-ZZ*. (B) und (D) *pYD-pGAPDH-app8-VHH1-Fc/pYD-ZZ*. Die Detektion der ZZ-Domäne erfolgte über einen Protein A-spezifischen Antikörper aus der Ziege (FITC-Konjugat). Die Detektion des VHH-Fc Fusionsproteins über ein Fcspezifisches F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647 Konjugat). Grau: Kultivierung in Glukose-haltigem Medium, rot: Kultivierung in Galaktose-haltigem Medium.

Durch die in Abb. 4.37 dargestellten FACS-Histogramme wird das einheitliche Verhalten beider Promotorpaare in Bezug auf die Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen deutlich. Durch die Kultivierung in Glukose-haltigem Medium war weder die ZZ-Domäne (grau Abb. 4.37 A und B), noch das VHH-Fc Fusionsprotein (grau, Abb. 4.37 C und D) auf der Zelloberfläche präsentiert. Durch die Kultivierung der Zellen in Galaktose-haltigem Medium konnte unter Verwendung beider Promotorpaare sowohl die ZZ-Domäne (rot, Abb. 4.37 A und B) als auch das VHH-Fc Protein (rot, Abb. 4.37 C und D) auf der Zelloberfläche durch Interaktion mit dem Fc-spezifischen Nachweisantikörper markiert und durchflusszytometrisch detektiert werden.

Im nächsten Schritt wurde das Verhalten des Promotorpaares pGAPDH/pGal1 genauer analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen der Glukose-haltigen Kultur zur Induktion der Oberflächenpräsentation in Galaktose-haltiges Medium + PEG8000 überführt und 48 Stunden bei 20 °C und 250 Upm kultiviert. Der Nachweis der Genexpression von ZZ-Domäne und

VHH-Fc Konstrukt erfolgte über die Fluoreszenzmarkierung der Oberflächen-präsentierten Proteine und die Analyse der Zellen im Durchflusszytometer (Kapitel 3.1.14 und 3.1.15). Die ZZ-Domäne wurde über einen Protein A-spezifischen FITC-markierten Antikörper aus der Ziege (rel. Fluoreszenz grün), das VHH-Fc Fusionsprotein über ein Fc-Fragment spezifisches F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) aus der Ziege (rel. Fluoreszenz rot) markiert. Die Ergebnisse dieser Messung ist in Abb. 4.38 A dargestellt. Anschließend wurde Glukose-haltiges Medium mit Zellen aus der Galaktose-haltigen Kultur inokuliert. Die zur Herstellung dieser Kultur verwendete Zelldichte betrug  $0,5 \times 10^7$  Zellen/ml. Die Zellen wurden anschließend 48 Stunden bei 30 °C und 250 Upm kultiviert. Es schloss sich ein erneuter Transfer der Zellen an. Zu diesem Zweck wurde frisches Glukose-haltiges Medium + PEG8000 mit einer äußerst geringen Zelldichte der vorausgegangenen Kultur inokuliert. Diese Kultur wurde für 48 Stunden bei 20 °C und 250 Upm zur löslichen Produktion des VHH-Fc Fusionsproteins kultiviert. Anschließend wurde die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne und des VHH-Fc Fusionsproteins wieder mittels Fluoreszenzmarkierung (s.o.) und Durchflusszytometrie analysiert. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 4.38 B gezeigt.

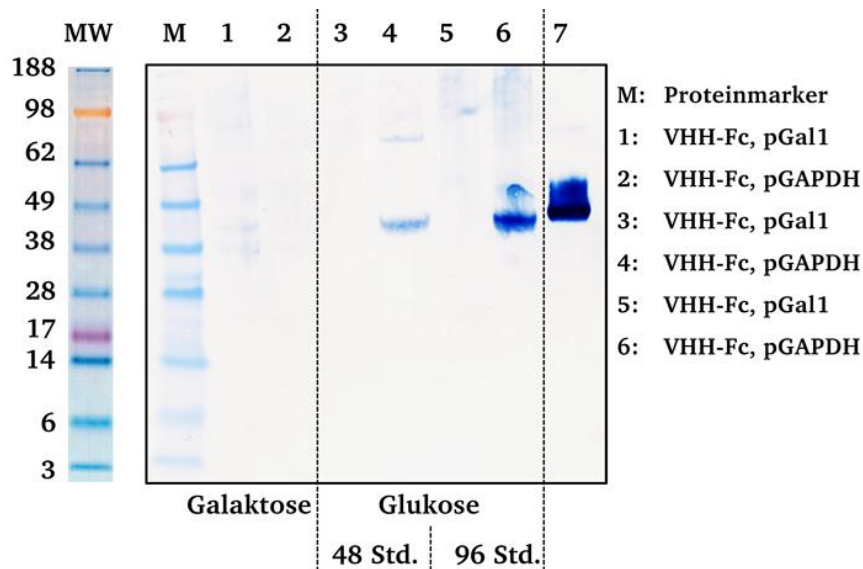


**Abb. 4.38: Selektiver Wechsel zwischen Oberflächenpräsentation und löslicher Produktion.**

Zwei-Farben-Markierung und Durchflusszytometrie von EBY100. In (A) ist die Kultivierung von Zellen in Galaktose-haltigem Medium (+PEG8000) gezeigt. Die rel. Fluoreszenz grün zeigt die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne. Die rel. Fluoreszenz rot zeigt die Oberflächenpräsentation der nicht-kovalent präsentierten VHH-Fc Fusionsproteine. Durch den Transfer der Zellen in Glukose-haltiges Medium (+PEG8000) (B) sind ZZ-Domäne und VHH-Fc Fusionsprotein nicht mehr auf der Zelloberfläche detektierbar (vgl. M1 A und M1 B).



Abb. 4.38 verdeutlicht die erfolgreiche Reprimierung der Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne durch den Transfer der Zellen in Glukose-haltiges Medium (Abb. 4.38 B). Dadurch wurde ebenfalls die Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine unterbunden, da diese nicht mehr auf der Zelle eingefangen werden konnten, jedoch weiter sekretiert wurden. Zur Analyse des Verhaltens beider Promotorpaare in Bezug auf die lösliche Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand wurden Western-Blot Analysen der Kulturüberstände angefertigt. Nach Bestimmung der Zelldichte (Kapitel 3.1.7) der zuvor beschriebenen Glukose- und Galaktose-haltigen Kulturen wurden Proben der Kulturüberstände eines Volumens, entsprechend  $1 \times 10^7$  Zellen entnommen und wie in Kapitel 3.2.6 mittels TCA präzipitiert und wie in Kapitel 3.2.9 beschrieben für die LDS-PAGE und Western-Blot Analyse aufgearbeitet. Je eine Probe wurde nach Kultivierung in Galaktose-haltigem Medium (Abb. 4.39 Spur 1 und 2) und je eine Probe nach 48-stündiger Kultivierung (Abb. 4.39 Spur 3 und 4) in Glukose-haltigem Medium entnommen. Zusätzlich wurden die Glukose-haltigen Kulturen weitere 48 Stunden ( $\triangleq$  96 Std.) kultiviert, da die optimale Expressionsdauer des VHH-Fc Fusionsproteins unter Verwendung des GAPDH-Promotors nicht bekannt war und so experimentell überprüft wurde. Als Positivkontrolle wurde ein HEK293-exprimiertes VHH-Fc Fusionsprotein verwendet (Abb. 4.39 Spur 7). Die Ergebnisse der Western-Blot Analyse sind im Folgenden dargestellt.



**Abb. 4.39: Analyse zur schaltbaren Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen.**

Western-Blot Analyse der mittels TCA präzipitierten Proteinfractionen im Überstand von VHH-Fc Expressionskulturen. Untersucht wurde das Verhalten des Gal1-Promotors und des GAPDH-Promotors in Galaktose- und Glukose-haltigem Medium. Die Detektion der VHH-Fc Fusionsproteine auf der PVDF-Membran erfolgte über einen Fc-Fragment spezifischen Primärantikörper (Kaninchen) und einem Kaninchen-spezifischen POD-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege).

Wie aus Abb. 4.39 zu erkennen ist, konnte das VHH-Fc Fusionsprotein während der Kultivierung in Galaktose-haltigem Medium bei beiden Promotorpaaren im Kulturüberstand nicht detektiert werden (Spur 1 und 2). Durch den Transfer in Glukose-haltiges Medium war unter Verwendung des Gal1/GAPDH Promotorpaares ein Fc-spezifisches Signal im Western-Blot erkennbar (Spur 4) und demnach das VHH-Fc Protein im Kulturüberstand nachweisbar. Durch die weitere Kultivierung konnte die Stärke des Signals erhöht und die andauernde Genexpression und die nachfolgende Akkumulierung der Proteine im Kulturmedium nachgewiesen werden (Spur 6). Daraus ließ sich schließen, dass die längere Expressionsdauer zu einer erhöhten VHH-Fc Konzentration im Kulturüberstand geführt hat. Bei Verwendung des Gal1/Gal1 Promotorpaares wurde weder nach 48 Stunden noch nach 96 Stunden ein Fc-spezifisches Signal im Kulturüberstand detektiert (Abb. 4.39 Spur 3 und 5), da die Expression des Gal1-Promotors durch die im Medium vorhandene Glukose reprimiert war und die Genexpression für die VHH-Fc Fusion nicht erfolgte. Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich der Schluss ziehen, dass es durch Verwendung des Gal1/GAPDH Promotorpaares möglich war, die Lokalisation des VHH-Fc Fusionsproteins durch Änderung der Kultivierungsbedingungen von Oberflächenpräsentation zu löslicher Sekretion in den Kulturüberstand umzuschalten.

---

#### 4.19 Herstellung verschiedener VHH-Bibliotheken

---

Die Verwendung des nicht-kovalenten Verfahrens zur Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen wurde durch die Generierung von drei VHH-Bibliotheken und deren Oberflächenpräsentation auf Hefezellen erprobt. Die Herstellung der VHH-Bibliotheken erfolgte unter Verwendung dreier unterschiedlicher Technologien. Dadurch wurden Bibliotheken mit unterschiedlichen Sequenzdiversitäten generiert.

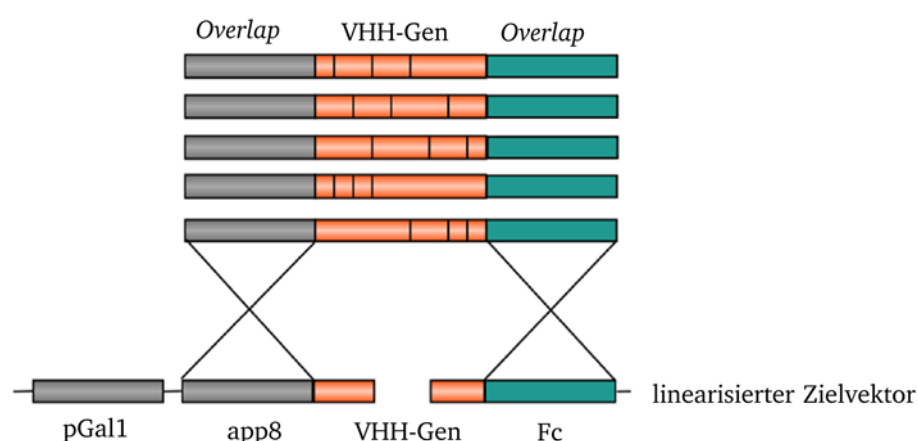
Die VHH-Bibliothek A wurde mittels zufallsbasierter Mutagenese erzeugt. Durch sequenzielle *Error-prone* PCR und unter Verwendung des *GeneMorph<sup>®</sup> II random mutagenesis Kit* (Agilent Technologies Inc.) erfolgte der zufällige Einbau von Punktmutationen in die Sequenz des VHH-Gens (Kapitel 3.3.5.2). Die mutagenisierten Sequenzvarianten wurden anschließend zur Klonierung der Bibliothek im Format der Fc-Fusion verwendet.

Die VHH-Bibliothek B wurde in Form eines Oligodesoxyribonukleotids von Eurofins MWG Operon synthetisiert. Das Syntheseprodukt entsprach der Sequenz des VHH-Gens mit einer vollständigen Randomisierung von CDR1 und CDR2. Nach Amplifizierung des Oligodesoxyribonukleotids wurden die PCR-Produkte zur Klonierung der Bibliothek verwendet.



Die VHH-Bibliothek C wurde unter Verwendung eines *S. cerevisiae* Stammes erstellt, der durch die Überexpression einer hyperaktiven Variante der humanen AID (*Activation-induced cytidine deaminase*) zur Mutation von *Hotspot*-Sequenzbereichen innerhalb der CDRs von humanen Antikörpermolekülen führt<sup>148</sup>. Durch die Transformation der Hefezellen mit dem Plasmid, welches für das VHH-Gen kodiert und der anschließenden Induktion der AID-Genexpression der Transformanten wurde der Mechanismus der somatischen Hypermutation, wie er aus Säugern während der B-Zellreifung bekannt ist, imitiert. Das sollte zum Einbau von Punktmutationen innerhalb der VHH-Sequenz führen. Die experimentelle Planung, die Transformation des Hefestamms, dessen Kultivierung, und die Induktion der Mutagenese wurde in diesem Fall freundlicherweise von Alexander Maass (Biochemie, TU Darmstadt, AK Prof. Kolmar) durchgeführt.

In Bibliothek A und C wurde das PCR-Produkt mittels *Gap-Repair-PCR* amplifiziert (Kapitel 3.3.3). In dieser PCR wurden unter Verwendung der Oligodesoxyribonukleotide *GR-ep-VHH1-up* und *GR-ep-VHH1-rp* 50 bp lange zum Zielvektor homologe Sequenzbereiche (*Overlap*) am 5'- und 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt (Abb. 4.40). Über diese Bereiche erfolgte die Klonierung der Bibliotheken mittels homologer Rekombination in Hefezellen. Hierzu wurde das von Benatuil etablierte Protokoll verwendet (Kapitel 3.1.8.2). Die Restriktion des Zielvektors initiierte den Reparaturmechanismus in der Hefezelle, der zur „Reparatur“ des Zielvektors über die homologen Bereiche des PCR-Produktes führte (Kapitel 3.3.3). Eine schematische Darstellung des Mechanismus der Bibliotheks-Klonierung ist Abb. 4.40 zu entnehmen.

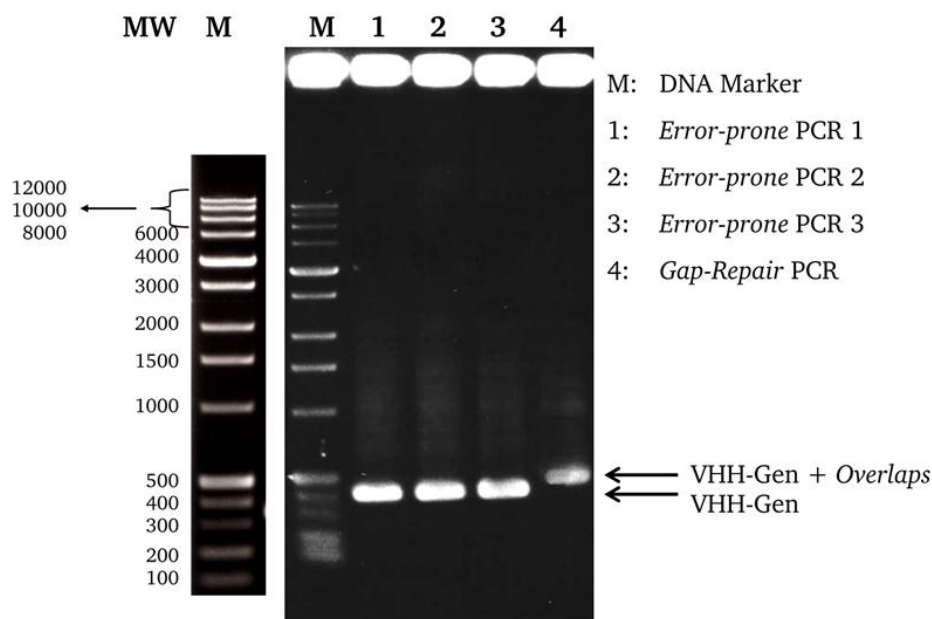


**Abb. 4.40: Klonierungsstrategie der VHH-Bibliotheken.**

Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Herstellung der VHH-Bibliotheken. Die mutierten Varianten der VHH-Sequenz (rot) werden über homologe Bereiche (*Overlap*) an den Enden der PCR-Produkte in den linearisierten Zielvektor eingebaut. Hierbei wird sich der Mechanismus der homologen Rekombination in Hefezellen zunutze gemacht.

#### 4.19.1 Herstellung der Bibliothek A

Die VHH-Bibliothek A basierte auf einer hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne und enthielt zufällige Punktmutationen, die über die gesamte Gen-Sequenz verteilt waren und mittels *Error-prone* PCR generiert wurden. Die *Error-prone* PCR wurde unter Verwendung des *GeneMorph® II random mutagenesis Kit* (Agilent Technologies Inc.) mit dem Matrizen-Plasmid *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* innerhalb von 30 Zyklen durchgeführt (Kapitel 3.3.5.2). Zu diesem Zweck wurden die spezifischen Oligodesoxyribonukleotide *ep-VHH1-up* und *ep-VHH1-rp* verwendet. Nach der Reinigung des PCR-Produkts (Kapitel 3.3.13) wurden 10 ng als Matrize für eine zweite *Error-prone* PCR eingesetzt. Der Vorgang wurde im Anschluss ein weiteres Mal wiederholt. Insgesamt wurden drei sequentielle *Error-prone* PCR-Runden durchgeführt. Aliquots der amplifizierten PCR-Produkte jeder *Error-prone* Runde wurden zur Analyse im Agarosegel (Kapitel 3.3.7) untersucht (Abb. 4.41).



**Abb. 4.41: Analyse von *Error-prone* und *Gap-Repair* PCR.**

PCR-Produkte der mittels *Error-prone* PCR amplifizierten VHH-Sequenzen. Spuren 1 bis 3 zeigen die amplifizierte VHH-Sequenz während der *Error-prone* PCR. Spur 4 zeigt die Amplifizierung des *Error-prone* PCR-Produkts mit *Gap-Repair* Oligodesoxyribonukleotiden. Angegeben sind die Molekulargewichte (MW) des DNA-Markers (M) in bp.

Zur Überprüfung der Qualität der PCR-Produkte wurde 1  $\mu$ l des *Error-prone* III PCR-Produkts in den Vektor pCR® 4-TOPO unter Verwendung des *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* (Life Technologies Corp.) kloniert (Kapitel 3.3.11) und 1,5  $\mu$ l des Ansatzes zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 Zellen verwendet (Kapitel 3.1.2). Die Transformanten

---

wurden anschließend mit M13-Oligodesoxyribonukleotiden (Kapitel 2.6) von Eurofins MWG Operon sequenziert. Das PCR-Produkt der dritten Runde wurde im Folgenden als Matrize für die *Gap-Repair* PCR verwendet (Kapitel 3.3.3). In diesem Schritt erfolgte das Anfügen von homologen Sequenzbereichen (Overlaps) zum Zielvektor *pYD-pGal1-app8-VHH2-Fc*, um die Klonierung der Bibliothek mittels homologer Rekombination in Hefezellen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden die Oligodesoxyribonukleotide *GR-ep-VHH1-up* und *GR-ep-VHH1-rp* verwendet. Das Anfügen homologer Sequenzbereiche wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und zeigte sich durch einen sichtbaren Größenzuwachs des PCR-Produkts (Abb. 3.41 Spur 4). Es wurden 192 PCR-Ansätze hergestellt aus denen final ca. 140  $\mu\text{g}$  PCR-Produkt isoliert wurden.

500  $\mu\text{g}$  des Zielvektors *pYD-pGal1-app8-VHH2-Fc* wurden zur Vorbereitung der Klonierung mit den Restriktionsendonukleasen *KasI* und *SacI* linearisiert (Kapitel 3.3.6) und wie in Kapitel 3.3.13 beschrieben gereinigt. Die anschließende Präzipitation der DNA erfolgte mittels Ammoniumacetat/Ethanol (Kapitel 3.3.1). Das PCR-Produkt wurde im Anschluss zur Transformation von elektrokompenten EBY100 Zellen verwendet, die bereits das Plasmid für die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne trugen (*pYD-ZZ*). Die Transformation wurde nach dem von Benatuil und Mitarbeitern etablierten Protokoll durchgeführt<sup>121</sup> (Kapitel 3.1.8.2). Durch die Herstellung geeigneter Verdünnungen und deren Ausplattierung auf Selektivagarplatten wurde eine Bibliotheksgröße von annähernd  $5,6 \times 10^8$  unabhängigen Klonen ermittelt. Im folgenden Kapitel ist die Sequenzauswertung der Bibliothek gezeigt.

---

#### 4.19.2 Qualitätskontrolle der Bibliothek A

---

96 Transformanten der Subklonierung des PCR-Produkts wurden zur Sequenzierung verwendet. Die Anzucht der Transformanten, die Plasmidisolierung und die anschließende Sequenzierung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon. Die Auswertung der von Eurofins MWG Operon zu Verfügung gestellten Daten erfolgte mit dem Sequenzanalyse Programm *Lasergene*<sup>®</sup> (DNASTAR Inc.) im Vergleich mit der Sequenz der Ausgangs-VHH-Domäne. Einen Überblick über die Mutationsverteilung innerhalb der VHH-Domäne auf Aminosäureebene von 57 zeigt Abb. 4.42.

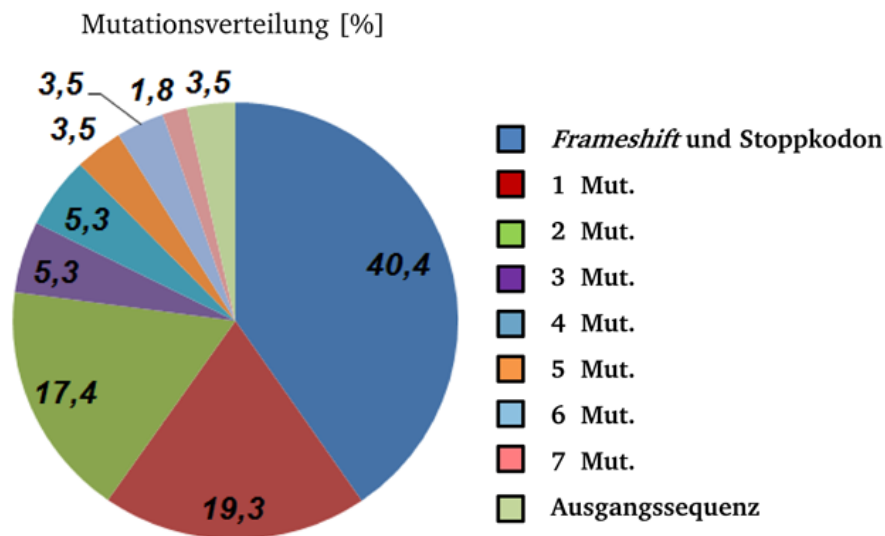


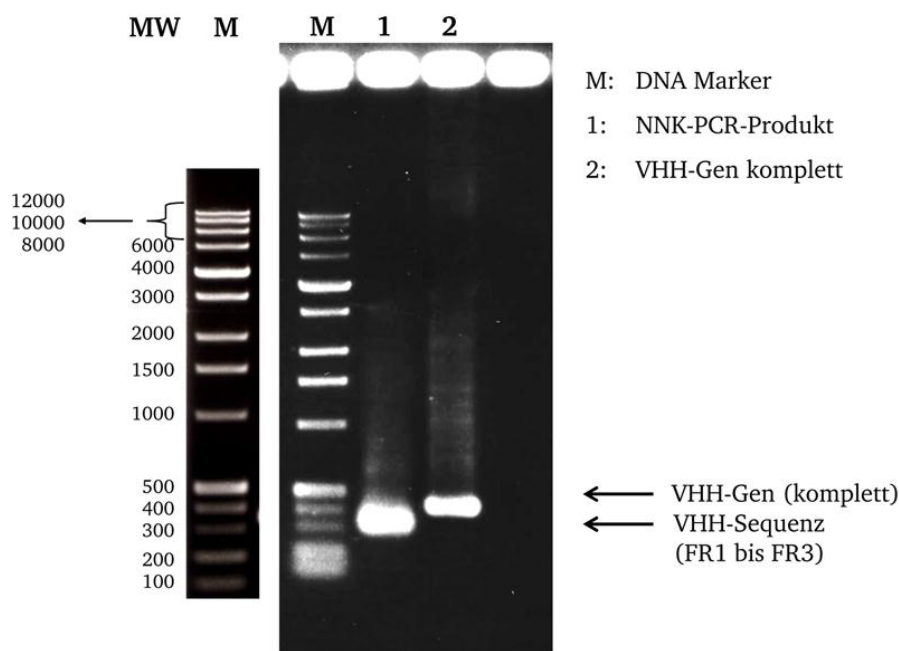
Abb. 4.42: Sequenzauswertung Bibliothek A.

Sequenzauswertung von 57 sequenzierten Klonen der mittels *Error-prone* PCR erstellten VHH-Bibliothek A. Die Auswertung der Mutationsverteilung erfolgte auf Aminosäureebene (Mut. = Mutationen). Die Datenbeschriftung ist angegeben in Prozent. (Die Legende spiegelt den Verlauf der Grafik im Uhrzeigersinn wider).

Wie aus Abb. 4.42 zu erkennen ist, zeigte der Hauptanteil der Bibliothek A (40%), Mutationen die zum Abbruch der Translation durch *Frameshifts* oder durch die Substitution mit einem Stoppkodon führten. 19% der Sequenzen wiesen eine, 17% wiesen zwei Aminosäuresubstitutionen auf. Eine höhere Mutationsrate war in der Bibliothek mit deutlich geringerer Präsenz vertreten. Drei und vier Aminosäuresubstitutionen waren mit jeweils 5%, fünf und sechs Aminosäuresubstitutionen mit 4% vertreten. Sieben Aminosäuresubstitutionen traten bei 2% Prozent der analysierten Sequenzen auf. Der Anteil an Sequenzen, die der Ausgangssequenz (hsEGFR-spezifische VHH-Sequenz) entsprachen, lag bei 4%. Die in Abb. 4.42 dargestellten Aminosäuresubstitutionen erstrecken sich über die komplette Länge der VHH-Domäne und waren zufällig verteilt. Die meisten Mutationen traten jedoch in *Famework* Bereichen zwischen den CDRs auf. Bei drei von 57 Sequenzen wurden Mutationen innerhalb der CDR 3 und CDR1, bei einer Sequenz wurde eine Mutation in CDR1 identifiziert.

#### 4.19.3 Herstellung der Bibliothek B

Von Eurofins MWG Operon wurden 800 ng des Oligodesoxyribonukleotids *VHH-NNK* (s. Anhang) synthetisiert, welches den 5'-Bereich des hsEGFR-spezifischen VHH-Gens abdeckte und in welchem die Sequenzen der CDR1 und CDR2 vollständig unter Verwendung von NNK-Kodonen randomisiert waren. Das lyophilisierte Syntheseprodukt wurde in 85  $\mu$ l sterilem Wasser gelöst, um eine DNA-Konzentration von ca. 10 ng/ $\mu$ l zu erzielen. Die hergestellte DNA-Lösung wurde anschließend als Matrize für die *Gap-Repair* PCR eingesetzt (Kapitel 3.3.3). Die PCR wurde mit den Oligodesoxyribonukleotiden *NNK-GR-up* und *NNK-GR-rp* in 192-facher Ausführung durchgeführt. Nach Reinigung des PCR-Produktes wurde eine finale Menge von 135  $\mu$ g ermittelt. Das zur Klonierung der Bibliothek verwendete PCR-Produkt ist in Abb. 4.43 gezeigt. Zur Analyse der PCR-Produktgröße wurde eine geringe Menge des PCR-Ansatzes nach der Reaktion mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Kapitel 3.3.7).



**Abb. 4.43: Amplifizierung der Bibliothek B.**

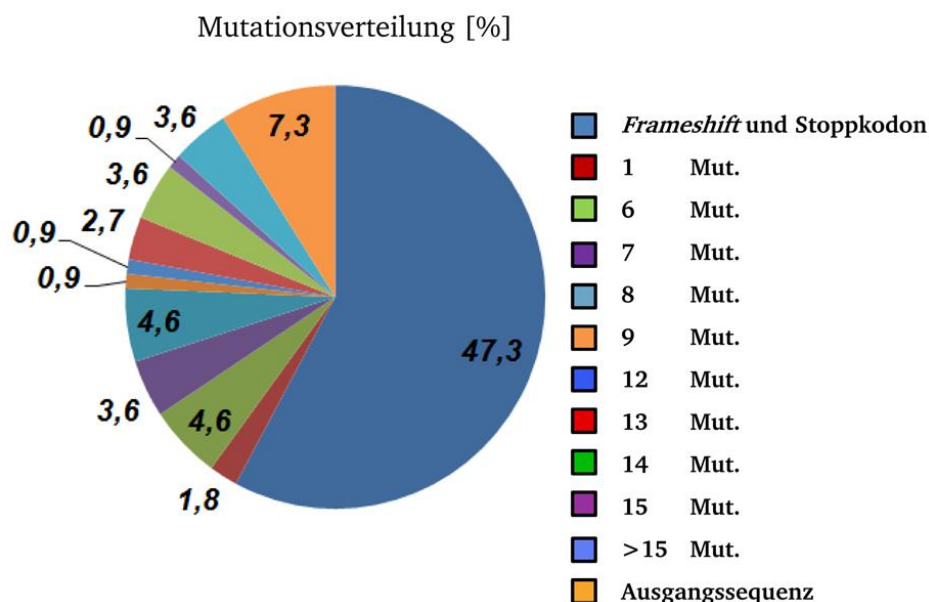
Dargestellt ist das PCR-Produkt des amplifizierten Oligodesoxyribonukleotids mit randomisierten CDR1 und CDR2 Sequenzbereichen, welches die Bibliothek B darstellt. Im Vergleich zur vollständigen VHH-Gensequenz (Spur 2) wurde ein PCR-Produkt mit geringerer Größe (Spur 1) amplifiziert. Angegeben sind die Molekulargewichte (MW) des DNA-Markers (M) in bp.

Zur Transformation von elektrokompenten EBY100 Zellen (*pYD-ZZ* Transformanten) wurden je 6  $\mu$ g des PCR-Produkts mit 4  $\mu$ g des zuvor linearisierten Plasmids *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* versetzt. Die Linearisierung erfolgte mit den Restriktions-

endonukleasen *KasI* und *EcoRI* (Kapitel 3.3.6). Der Restriktionsansatz wurde anschließend mit dem *Wizard® SV Gel & PCR Clean-up System* aufgereinigt (Kapitel 3.3.13) und dadurch das geschnittene Sequenz-Fragment (19 bp) entfernt. Die Transformation erfolgte nach dem von Benatuil und Mitarbeitern etablierten Protokoll<sup>121</sup> (Kapitel 3.1.8.2). Durch das Anfertigen von geeigneten Verdünnungen und deren Ausplattierung auf Selektivagarplatten konnte die Größe der Bibliothek bestimmt werden. Es wurden durchschnittlich  $4 \times 10^8$  unabhängige Transformanten bestimmt.

#### 4.19.4 Qualitätskontrolle der Bibliothek B

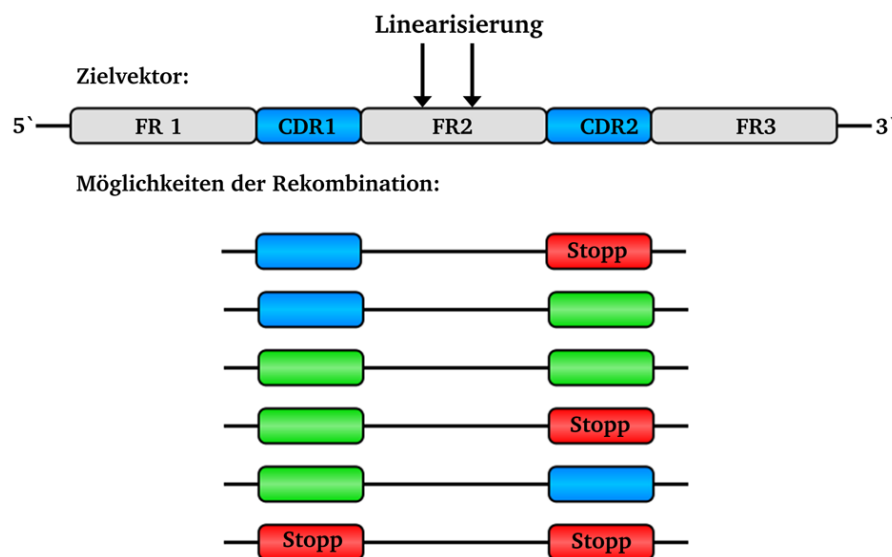
Im Folgenden ist die Analyse der Sequenzierung von 91 Klonen gezeigt (Abb. 4.43). Zu diesem Zweck wurde eine Plasmidisolierung eines Aliquots der Bibliothek angefertigt und zur Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 verwendet (Kapitel 3.1.2). Nach Selektion der Transformanten auf LB-Kana Agarplatten wurden diese von Eurofins MWG Operon mit geeigneten Oligodesoxyribonukleotiden sequenziert. Die Auswertung der Mutationsverteilung erfolgte im Vergleich zur Sequenz der hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne und ist in Abb. 4.44 gezeigt.



**Abb. 4.44: Sequenzanalyse Bibliothek B.**

Sequenzauswertung von 91 sequenzierten Klonen der mittels CDR1 und CDR2 Randomisierung erstellten VHH-Bibliothek. Die Auswertung erfolgte auf Aminosäureebene (Mut. = Mutationen). Die Datenbeschriftung ist angegeben in Prozent. (Die Legende spiegelt den Verlauf der Grafik im Uhrzeigersinn wider).

Im Vergleich zur Sequenzauswertung der mittels *Error-prone* Mutagenese erstellten Bibliothek A zeigt die Auswertung in Abb. 4.44 das vermehrte Auftreten von Mutationen in der Bibliothek B. Der Anteil an Aminosäuresubstitutionen, die zu einem Translationsstopp durch *Frameshifts* oder den Einbau eines Stoppkodons führten, lag bei über 47%. 3,6% der analysierten Sequenzen zeigen mehr als 15 Aminosäuresubstitutionen im Vergleich zur Ausgangssequenz. Die restliche Verteilung der Aminosäuresubstitutionen ist Abb. 4.44 zu entnehmen. Durch die Verwendung eines Oligodesoxyribonukleotid mit randomisierten CDR1 (acht Aminosäurereste) und CDR2 (sieben Aminosäurereste) Sequenzabschnitten traten die oben genannten Aminosäuresubstitutionen hauptsächlich in den Sequenzbereichen von CDR1 und CDR2 auf. Der Bereich der CDR3 war dadurch nicht von Aminosäuresubstitutionen betroffen. Allerdings traten einzelne Aminosäuresubstitutionen auch in *Framework* 1 und 2 auf. Die homologen Sequenzbereiche von *Framework* 1, 2 und 3 des synthetisierten Oligodesoxyribonukleotids und der Umstand, dass der Zielvektor innerhalb von *Framework* 2 linearisiert wurde, erklären die verschiedenen Rekombinationsereignisse und das Vorhandensein von VHH-Sequenzen mit nur einer randomisierten CDR-Sequenz. Die verschiedenen Möglichkeiten der Rekombination während der Herstellung der Bibliothek B sind in Abb. 4.45 schematisch dargestellt.



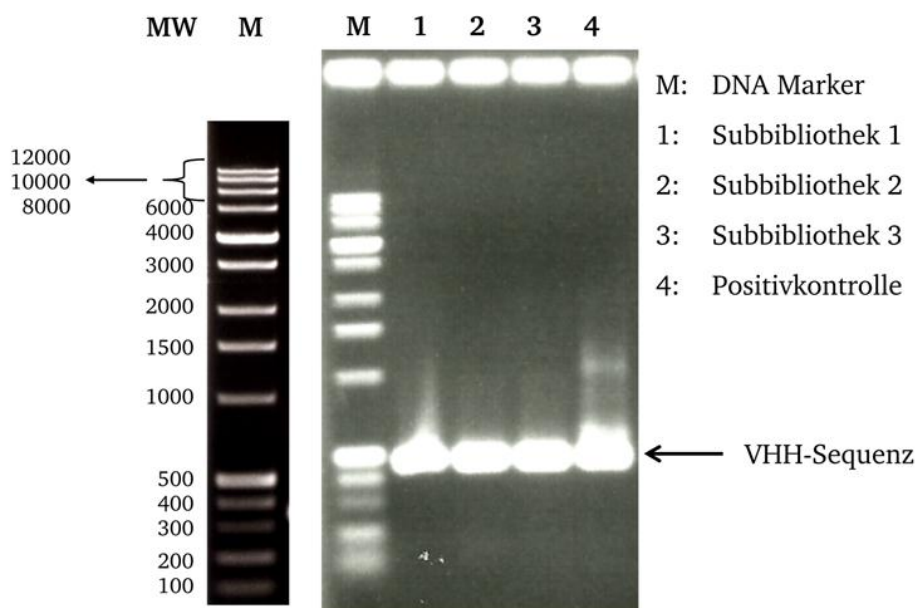
**Abb. 4.45: Mögliche Rekombinationsereignisse während der Generierung der Bibliothek B.**

Im Zielvektor ist die Rekombinationsstelle gezeigt, die durch Linearisierung des Zielvektors mit zwei Restriktionsendonukleasen definiert wurde. Das zur Generierung der Bibliothek B verwendete Oligodesoxyribonukleotid mit randomisierten CDR1 und CDR2-Sequenzen kann über homologe Sequenzbereiche in FR1, FR2 und FR3 rekombinieren. Die möglichen Rekombinationsprodukte sind unterhalb des schematisch gezeigten Zielvektors farbig dargestellt. Blau: CDR-Sequenzen entsprechend dem Zielvektor. Grün: CDR-Sequenzen mit zum Zielvektor unterschiedlichen Sequenzen (Randomisierung). Rot: Durch die Randomisierung entstandene Stoppkodone.



#### 4.19.5 Herstellung der Bibliothek C

Durch heterologe Expression einer mutierten und hyperaktiven Variante der AID<sup>148</sup> in Hefezellen wurde der Mechanismus der somatischen Hypermutation, wie er natürlicherweise während der B-Zellreifung auftritt, imitiert und für die Generierung der VHH-Bibliothek C genutzt. Die Mutagenese der hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne wurde freundlicherweise von A. Maass (Biochemie, TU Darmstadt, AK Prof. Kolmar) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden elektrokompente Zellen Hefezellen mit dem Plasmid *pYD-pGal1-app8-VHH1-Fc* transformiert und 10 Tage unter Induktion der Mutagenese kultiviert. Nach Abschluss der Mutagenese wurden die VHH-kodierenden Plasmide aus drei unabhängigen Kulturen isoliert und als Matrize für die *Gap-Repair* PCR zur Amplifizierung der VHH-Sequenz mit zum Zielvektor homologen Sequenzbereichen mit den Oligodesoxyribonukleotiden *GR-ep-VHH1-up* und *GR-ep-VHH1-rp* eingesetzt (Kapitel 3.3.3). Zur Plasmidisolierung wurden Zellen von drei unabhängigen Mutagenese-Kulturen eingesetzt. Insgesamt wurden 144 PCR-Reaktionen durchgeführt. Zur Überprüfung der PCR wurde im Anschluss eine Analyse der Produkte mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.3.7) durchgeführt (Abb. 4.46).



**Abb. 4.46: Amplifizierung der Subbibliotheken 1-3 zur Generierung der Bibliothek C.**

Agarosegelelektrophorese der *Gap-Repair* PCR-Produkte die zur Klonierung der Bibliothek C verwendet wurden. Als Subbibliothek 1, 2 und 3 wurden die drei unabhängigen Mutagenese-Ansätze (Kulturen) bezeichnet aus welchen die Plasmid-DNA als Matrize für die PCR diente. Als Positivkontrolle wurde das *Gap-Repair* PCR-Produkt der Bibliothek A verwendet. Angegeben sind die Molekulargewichte (MW) des DNA-Markers (M) in bp.



Nach Bestätigung der erfolgreichen Amplifizierung der VHH-Sequenz wurden die PCR-Produkte gereinigt (Kapitel 3.3.13) und die DNA-Konzentration bestimmt (Kapitel 3.3.9). Insgesamt wurde eine Ausbeute 180  $\mu\text{g}$  erzielt. Zur Klonierung der PCR-Produkte in den Zielvektor und damit zur Herstellung der Bibliothek C im Format einer Fc-Fusion, wurde das Plasmid *pYD1-pGal1-app8-VHH2-Fc* mit den Restriktionsendonukleasen *SacI* und *KasI* linearisiert und zur Co-Transformation von elektrokompenten EBY100 Zellen (*pYD-ZZ* Transformanten) mit dem zuvor generierten PCR-Produkt verwendet. Hierfür wurde das von Benatuil und Mitarbeitern entwickelte Protokoll<sup>121</sup> verwendet (Kapitel 3.1.8.2). Nach der Herstellung von geeigneten Verdünnungen, deren Ausplattierung auf Selektivagarplatten und der anschließenden Auswertung durch das Auszählen der angewachsenen Kolonien wurde eine Bibliotheksgröße von ungefähr  $1,5 \times 10^9$  unabhängigen Klonen ermittelt.

#### 4.19.6 Qualitätskontrolle der Bibliothek C

Zur Abschätzung der VHH-Sequenzdiversität der Bibliothek C wurden Zellen der Mutagenese-Kulturen aus Kapitel 4.19.5 erneut zur Plasmidisolierung verwendet. Anschließend erfolgte die Amplifizierung der VHH-Sequenz unter Verwendung der der Oligodesoxyribonukleotide *ep-VHH1-up* und *ep-VHH1-rp* und der *HotStar® HiFidelity Polymerase* (Qiagen GmbH) mittels PCR (Kapitel 3.3.4) und deren Subklonierung unter Verwendung des Kits *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing* (Life Technologies Corp.) (Kapitel 3.3.12). Die anschließende Sequenzierung mit *M13-fw/M13-rev* Oligodesoxyribonukleotiden wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Die Mutationsverteilung ist in Abb. 4.47 gezeigt.

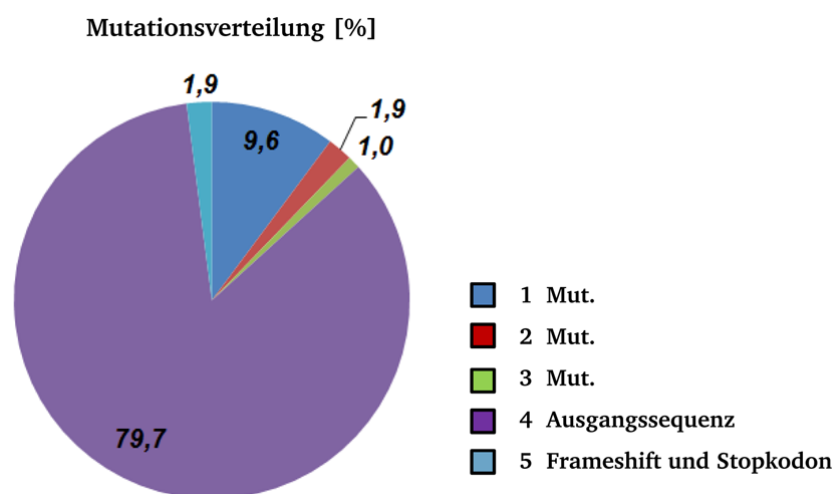


Abb. 4.47: Sequenzauswertung der Bibliothek C.

Die Auswertung erfolgte auf Aminosäureebene. Die Datenbeschriftung ist in Prozent angegeben. Zugrunde gelegt sind die Sequenzen von 96 unabhängigen Klonen der Bibliothek C.

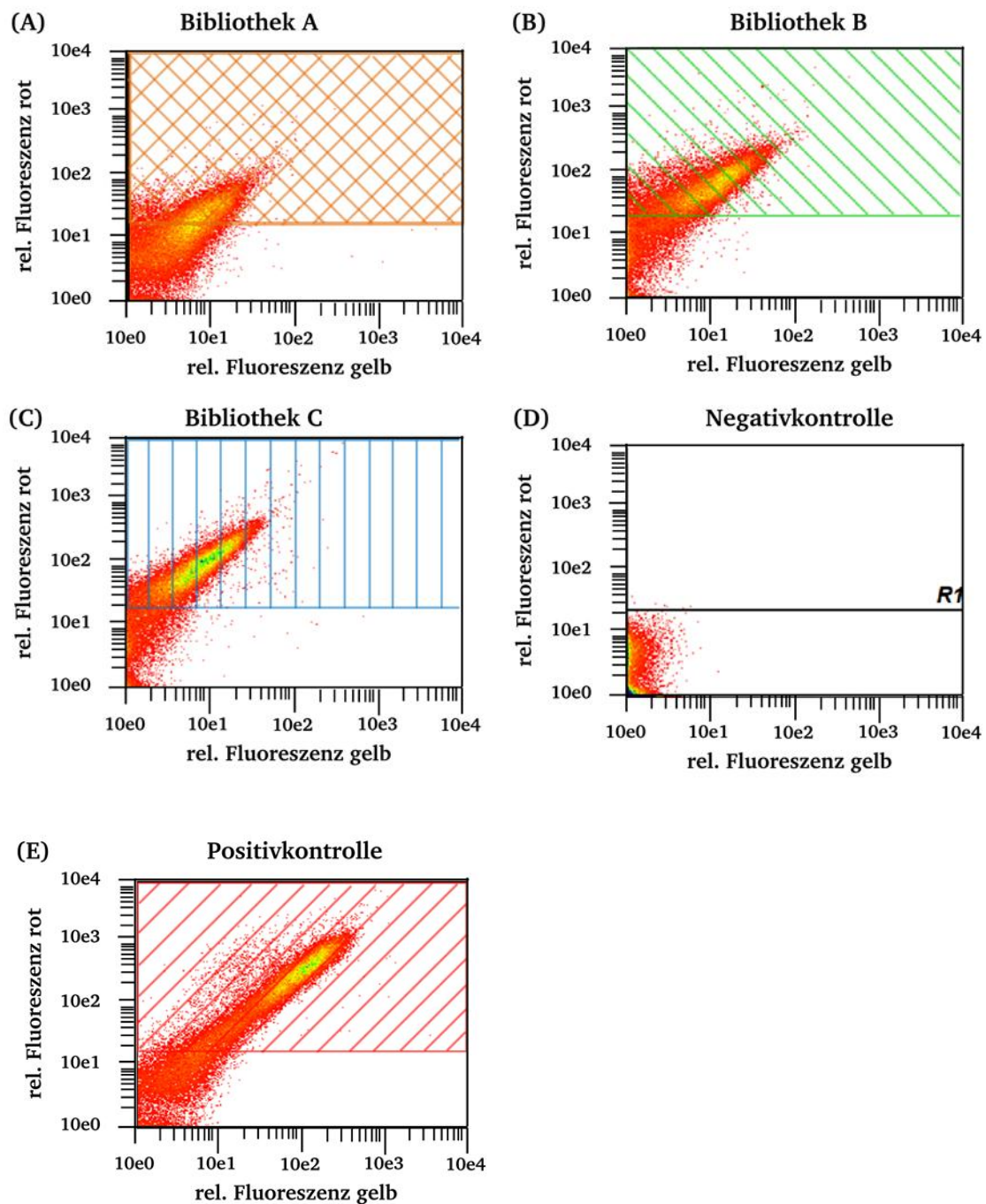
Im Vergleich zu den beiden zuvor gezeigten VHH-Bibliotheken A und B ergab sich nach Auswertung der VHH-Sequenzen ein deutlich anderes Bild für die Bibliothek C. Der Hauptteil der Bibliothek (Abb. 4.47) entsprach mit knapp 80% der der Ausgangssequenz (hsEGFR-spezifische VHH-Sequenz). Bei diesen Sequenzen wurden keine Mutationen vorgefunden. Lediglich 14,4% der Sequenzen wiesen Aminosäuresubstitutionen auf, davon waren 1,9% aufgrund von *Frameshifts* und der Substitution mit Stoppkodonen verkürzte und folglich unbrauchbare Sequenzen. Eine und zwei Aminosäuresubstitutionen traten mit einer Häufigkeit von 1,9% auf, drei Aminosäuresubstitutionen kamen mit einer Häufigkeit von 1% vor. 15% der Sequenzen die Mutationen aufwiesen, zeigten diese im Bereich der CDR1 und CDR2. Die restlichen Mutationen waren in den *Framework* Bereichen lokalisiert. Insgesamt wies diese Bibliothek somit die geringste Sequenzdiversität auf.

---

#### 4.20 Charakterisierung der Bibliotheken

---

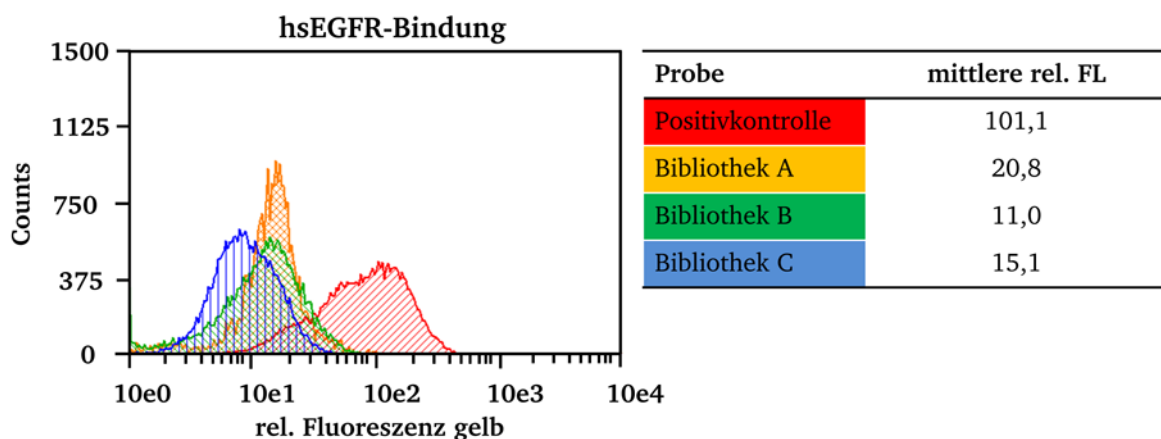
Die Oberflächenpräsentation der drei generierten VHH-Bibliotheken (A, B und C) wurde anschließend durchflusszytometrisch analysiert, um die Oberflächenpräsentation der Bibliotheken und die vorhandene Rest-Spezifität für das Antigen hsEGFR zu abzuschätzen. Zu diesem Zweck wurden  $1 \times 10^9$  Zellen jeder Bibliothek aus einer stationär wachsenden Vorkultur entnommen und zur Herstellung von Expressionskulturen verwendet (Kapitel 3.1.14). Die Oberflächenpräsentation wurde in Galaktose-haltigem SD-Medium + PEG8000 durchgeführt. Die Bibliotheken wurden in einem Volumen von 100 ml für 48 Stunden bei 20 °C und 180 Upm im Schüttelinkubator kultiviert. Im Anschluss wurden die Zelldichten der Kulturen bestimmt (Kapitel 3.1.7) und pro Bibliothek  $1 \times 10^8$  Zellen entnommen. Unter Verwendung von biotinyliertem Antigen hsEGFR (1  $\mu$ M), SA-PE (1 zu 10 verdünnt) und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) aus der Ziege wurde eine Zwei-Farben-Markierung der Zellen sequentiell wie in Kapitel 3.1.15 beschrieben durchgeführt. Dadurch konnte das Vorhandensein von Oberflächen-präsentierten VHH-Fc Fusionsproteinen und die Antigen-Bindung dieser Proteine analysiert werden. Als Positivkontrolle wurde das parentale hsEGFR-spezifische VHH-Fc Fusionsprotein auf der Oberfläche von EBY100 Zellen präsentiert und in gleicher Weise markiert. Als Negativkontrolle wurden EBY100 Zellen, die keine Oberflächenpräsentation zeigten, in gleicher Weise markiert. Die Proben wurden im Folgenden im MoFlo® Zytometer analysiert (Kapitel 3.1.17). Die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 4.48 dargestellt.



**Abb. 4.48: Oberflächenpräsentation und hEGFR-Bindung der VHH-Bibliotheken A, B und C.**

Zwei-Farben-Markierung der drei VHH-Bibliotheken. Gezeigt sind die FACS-Analysen der Bibliothek A (**A**), Bibliothek B (**B**) und Bibliothek C (**C**). Bei der in (**D**) gezeigten Analyse der Negativkontrolle handelte es sich um EBY100 Zellen, die das VHH-Fc Fusionsprotein nicht auf ihrer Oberfläche präsentierten. Bei der in (**E**) gezeigten Positivkontrolle handelte es sich um EBY100, die die hEGFR-spezifische VHH-Domäne auf der Oberfläche präsentierten. Alle Proben wurden mit biotinyliertem hEGFR, SA-PE (rel. Fluoreszenz gelb) und einem Fc $\gamma$ -Fragment spezifischen F(ab') $_2$  Fragment aus der Zeige (AlexaFluor<sup>®</sup> 647-Konjugat) (rel. Fluoreszenz rot) markiert. Pro FACS-Analyse sind 50.000 Ereignisse gezeigt.

Die in Abb. 4.48 dargestellten FACS-Analysen der verschiedenen VHH-Bibliotheken zeigten im Vergleich zur Positivkontrolle ein deutlich unterschiedliches Ergebnis. Die Positivkontrolle zeigte wie erwartet ein starkes gelbes und rotes Fluoreszenzsignal (Abb. 4.48 E). Das deutete auf eine funktionelle Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine und deren Bindung an das Antigen hsEGFR hin. Die farblich dargestellten Schraffierungen repräsentieren die Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine. Die drei erstellten Bibliotheken zeigten eine geringere Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine (Abb. 4.48 A, B und C) im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 4.48 E), was durch ein schwächeres rotes Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte. Zusätzlich zu der verringerten Oberflächenpräsentation wurde für alle Bibliotheken ein im Vergleich zur Positivkontrolle reduziertes gelbes Fluoreszenzsignal gemessen. Das war auf die reduzierte Bindung des Antigens hsEGFR zurückzuführen. Da alle drei Bibliotheken auf der Sequenzgrundlage der hsEGFR-bindenden VHH-Domäne generiert wurden, wurde ein gewisser Erhalt der hsEGFR-Spezifität vermutet und durch diese FACS-Analyse bestätigt. Um die noch vorhandene hsEGFR-Spezifität der Bibliotheken vergleichend zu analysieren, wurden die gelben Fluoreszenzsignale über eine Markerregion normalisiert und miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurde die Markerregion R1, basierend auf den Analysen von Negativ- und Positivkontrolle definiert (Abb. 4.48 D und E). Die innerhalb der Markerregion R1 lokalisierten Signale wurden anschließend zur Analyse der hsEGFR-Bindung der Bibliotheken verwendet (Abb. 4.48 A bis C). Die mittleren relativen gelben Fluoreszenzintensitäten dieser Signale sind zum Vergleich mit der Positivkontrolle in Abb. 4.49 dargestellt.



**Abb. 4.49: Analyse der hsEGFR-Bindung der Bibliotheken.**

Überlagerung der mittleren relativen gelben Fluoreszenzsignale (Antigen-Bindung) aus Abb. 4.48 für die Markierung mit b-hsEGFR und SA-PE. Orange: Bibliothek A, grün: Bibliothek B, blau: Bibliothek C, rot: Positivkontrolle (Oberflächenpräsentation der hsEGFR-spezifische VHH-Domäne als Fc-Fusion über die ZZ-Domäne auf EBY100 Zellen).

Aus dem in Abb. 4.49 dargestellten Ergebnis wurde deutlich, dass alle erstellten Bibliotheken eine gewisse Rest-Spezifität für das Antigen hsEGFR zeigten. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Abb. 4.49 rote Kurve) waren diese jedoch reduziert. Im direkten Vergleich zeigte die Bibliothek B das geringste Signal (mittlere rel. FL: 11,0). Bibliotheken A und C zeigten geringfügig stärkere Signale (Abb. 4.49). Abschließend kann festgehalten werden, dass die Oberflächenpräsentation der generierten VHH-Bibliotheken als Fc-Fusion über die ZZ-Domäne erfolgreich war. Die erzielten Ergebnisse entsprachen der Erwartung einer reduzierten Antigenbindung, die durch die eingefügten Mutationen hervorgerufen wurde. Allerdings wurde beobachtet, dass alle drei Bibliotheken eine im Vergleich zur Positivkontrolle deutliche schwächere Oberflächen-präsentation der VHH-Fc Fusionsproteine zeigten.

---

#### 4.21 Durchmusterung der Bibliothek A

---

Im nachfolgend dargestellten Experiment wurden die mittels *Error-prone* erstellte VHH-Bibliothek A nach VHH-Varianten durchmustert, die das Antigen mmEGFR (EGFR aus *Mus musculus*) binden. Damit sollte eine Kreuzspezifität der hsEGFR (*Homo sapiens*) spezifischen VHH-Domäne generiert werden, auf welcher die Bibliothek basierte, da die Bibliothek wie zuvor gezeigt noch eine Spezifität für hsEGFR zeigte. Das Antigen mmEGFR wurde gewählt, da durch eine zuvor durchgeführte Sequenzanalyse gezeigt wurde, dass hsEGFR und mmEGFR 89% Sequenzhomologie aufweisen (s. Anhang). Dadurch wurde sich eine erfolgreiche Selektion von kreuzspezifischen VHH-Varianten erhofft, die eine Spezifität für hsEGFR und mmEGFR aufweisen. Dieses Experiment diente als Modellanwendung des nicht-kovalenten Verfahrens zur Oberflächenpräsentation auf Hefezellen.

Zu diesem Zweck wurde die Oberflächenpräsentation der Bibliothek wie in Kapitel 3.1.14 beschreiben induziert und die Kultur der Bibliothek 72 Stunden bei 30 °C und 180 Upm kultiviert. Anschließend wurden  $5 \times 10^8$  Zellen mit 1,2  $\mu$ M b-mmEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) sequentiell wie in Kapitel 3.1.15 beschrieben markiert. Als Kontrolle (Kontrolle A) wurden EBY100 Zellen verwendet, die das hsEGFR-spezifische VHH-Fc Fusionsproteine (parentale VHH-Variante) auf ihrer Oberfläche präsentierten und die deshalb keine spezifische mmEGFR-Bindung zeigten (Abb. 4.50 A).  $1 \times 10^7$  dieser Zellen wurden in gleicher Weise markiert. Als weitere Kontrolle (Kontrolle B) wurden  $1 \times 10^7$  EBY100 Zellen, die die parentale VHH-Variante präsentierten nur mit SA-PE (1:10 verdünnt) markiert um den unspezifischen Bindungsanteil von SA-PE an die Zelloberfläche zu bestimmen (Abb. 4.50 B). Die so vorbereiteten Proben wurden im MoFlo®

Zytometer analysiert. Durch die Analyse beider Kontrollen konnte die Markerregion M1 definiert werden. Diese wurde so gewählt, dass möglichst wenige Zellen innerhalb dieser Region lokalisiert waren, da es sich in diesem Fall um eine unspezifische Markierung handelte. Anschließend wurden Fluoreszenz-markierte Zellen aus der Bibliothek A, die innerhalb der Markerregion (M1) lokalisiert waren, mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (Kapitel 3.1.17) in ein separates Auffanggefäß überführt (Abb. 4.50 C). In der ersten Sortierungs-Runde wurden  $2,33 \times 10^8$  Zellen der Bibliothek durchmustert und von diesen  $2,51 \times 10^5$  Zellen sortiert. Diese Zellen wurden im Anschluss unter Verwendung der selben Markerregion resortiert und so 3163 Zellen in ein weiteres Auffanggefäß überführt (Abb. 4.50 D). Die resortierten Zellen wurden in geeignetes Glukose-haltiges SD-Medium überführt und 48 Stunden kultiviert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurde eine Galaktose-haltige Expressionskultur mit einem Volumen von 50 ml wie in Kapitel 3.1.13 mit diesen Zellen inokuliert. Die Kultur wurde 24 Stunden bei 20 °C und 180 Upm kultiviert. Im Anschluss wurden  $1 \times 10^7$  Zellen der Kultur entnommen und erneut mit 1  $\mu$ M b-mmEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) sequentiell wie in Kapitel 3.1.15 beschrieben markiert und im MoFlo® Zytometer analysiert.  $5,9 \times 10^6$  der Zellen wurden durchmustert und von diesen mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (Kapitel 3.1.17)  $3,2 \times 10^3$  Zellen unter Verwendung der Markerregion M1 in ein separates Auffanggefäß überführt (Abb. 4.50 E). Diese Zellen wurden in Glukose-haltiges SD-Medium überführt und 72 Stunden wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen zur Herstellung einer Expressionskultur verwendet. Diese wurde wie in Kapitel 3.1.13 beschrieben hergestellt und 24 Stunden bei 20 °C und 180 Upm kultiviert. Im Anschluss wurden  $3 \times 10^7$  Zellen der Kultur entnommen und erneut mit 1,2  $\mu$ M b-mmEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) sequentiell wie in Kapitel 3.1.15 beschrieben markiert und im MoFlo® Zytometer analysiert (Abb. 4.50 F). Unter Verwendung der Markerregion M2 wurden  $1,59 \times 10^5$  Zellen von insgesamt  $1,8 \times 10^7$  durchmusterten Zellen in ein separates Auffanggefäß übertragen (Runde 3). Die Markerregion M2 war zu diesem Zweck leicht in Richtung verstärkter roter Fluoreszenz verschoben. Dadurch wurde die in Runde 3 aufgetretene neue Zellpopulation mit verstärkter roten Fluoreszenz (Abb. 4.50 F) sortiert. Durch die erneute FACS-Messung der so sortierten Zellen konnte eine Anreicherung der in M2 lokalisierten Zellen von 14,5% auf 34,4% gemessen werden (Abb. 4.50 G). Die Zellen wurden unter Verwendung der gleichen Marker-region resortiert. Insgesamt wurden  $8,29 \times 10^4$  Zellen resortiert, von welchen  $4,94 \times 10^4$  Zellen in ein separates Auffanggefäß überführt wurden (Abb. 4.50 H). Diese Zellen wurden erneut zur Herstellung einer Vorkultur verwendet und 48 Stunden bei 30 °C und wie in



---

Kapitel 3.1.4 beschrieben kultiviert. Nach Abschluss der Kultivierung und Bestimmung der Zelldichte wurde eine Expressionskultur dieser Zellen zur Induktion der Oberflächenpräsentation (Runde 4) hergestellt (Kapitel 3.1.13). Diese Kultur wurde anschließend 72 Stunden bei 20 °C und 250 Upm kultiviert und im Anschluss  $5 \times 10^7$  Zellen sequentiell mit 1  $\mu$ M b-mmEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) wie in Kapitel 3.1.15 beschrieben markiert. Die Zellen wurden anschließend im MoFlo® Zytometer analysiert und Fluoreszenz-markierte Zellen über die Markerregion M3 in ein separates Auffanggefäß sortiert (Abb. 4.50 I). Durch die Messung der sortierten Zellen konnte eine Anreicherung der Zellen innerhalb der Markerregion M3 von 0,7% auf 16,2% gemessen werden. Im Anschluss wurden diese Zellen unter Verwendung der Markerregion M4 resortiert. Im Vergleich zur Markerregion M3 war die Region M4 leicht nach rechts verschoben und erlaubte so die stringendere Resortierung bezüglich der mmEGFR-Bindung. Über diese Markerregion wurden in der sich anschließenden Resortierung dreimal jeweils 100 Einzelzellen mit der Sortiereinheit CyClone® auf Selektivagarplatten übertragen (Abb. 4.50 K). Die Agarplatten wurden anschließend drei Tage bei 30 °C inkubiert. In der nachfolgenden Abb. 4.50 sind die einzelnen Selektionsrunden der Bibliothek A gezeigt.

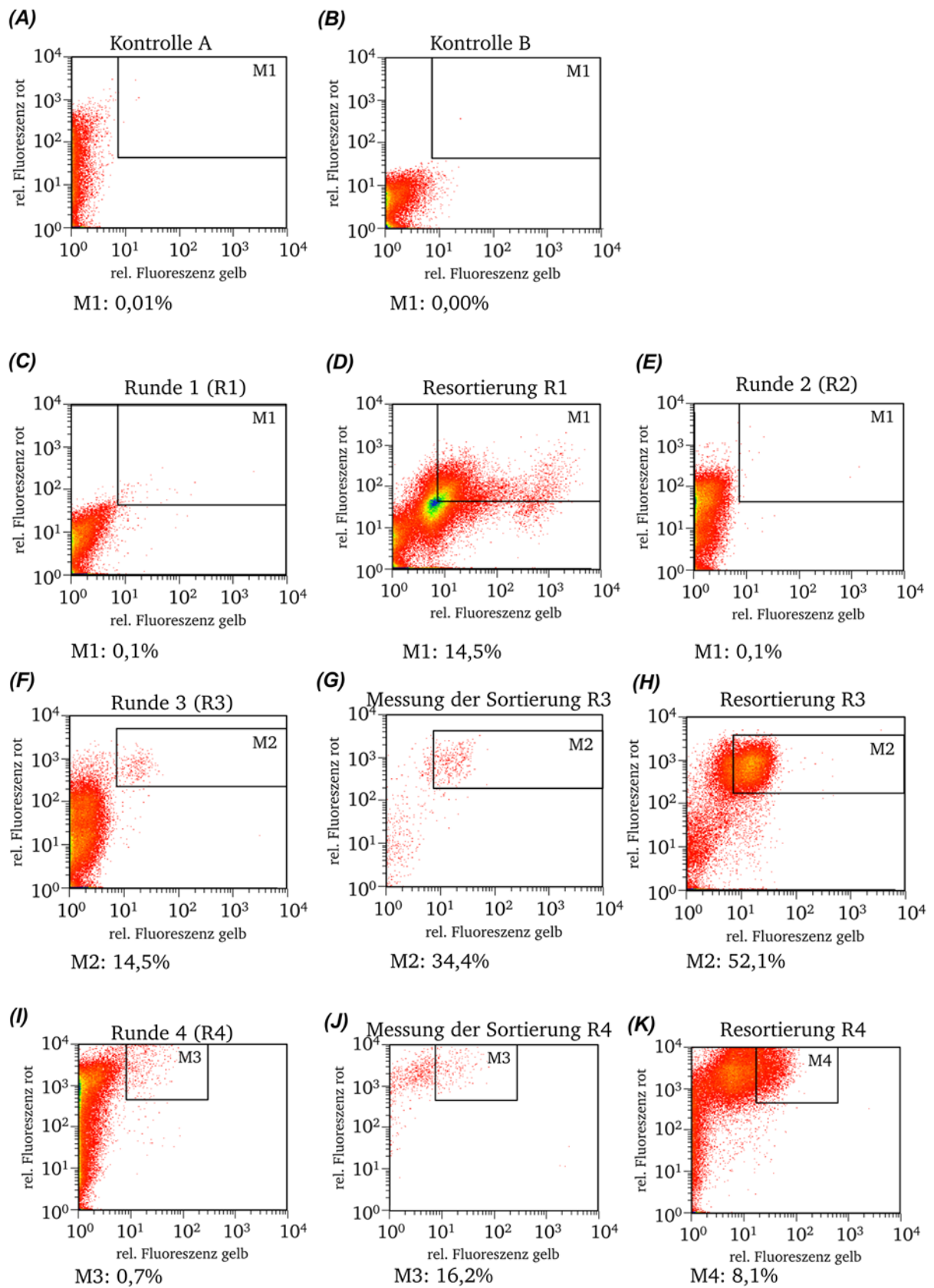


Abb. 4.50: Zwei-Farbenmarkierung und Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung der mit mmEGFR markierten VHH-Bibliothek A. (Die Beschreibung befindet sich auf Seite 147).

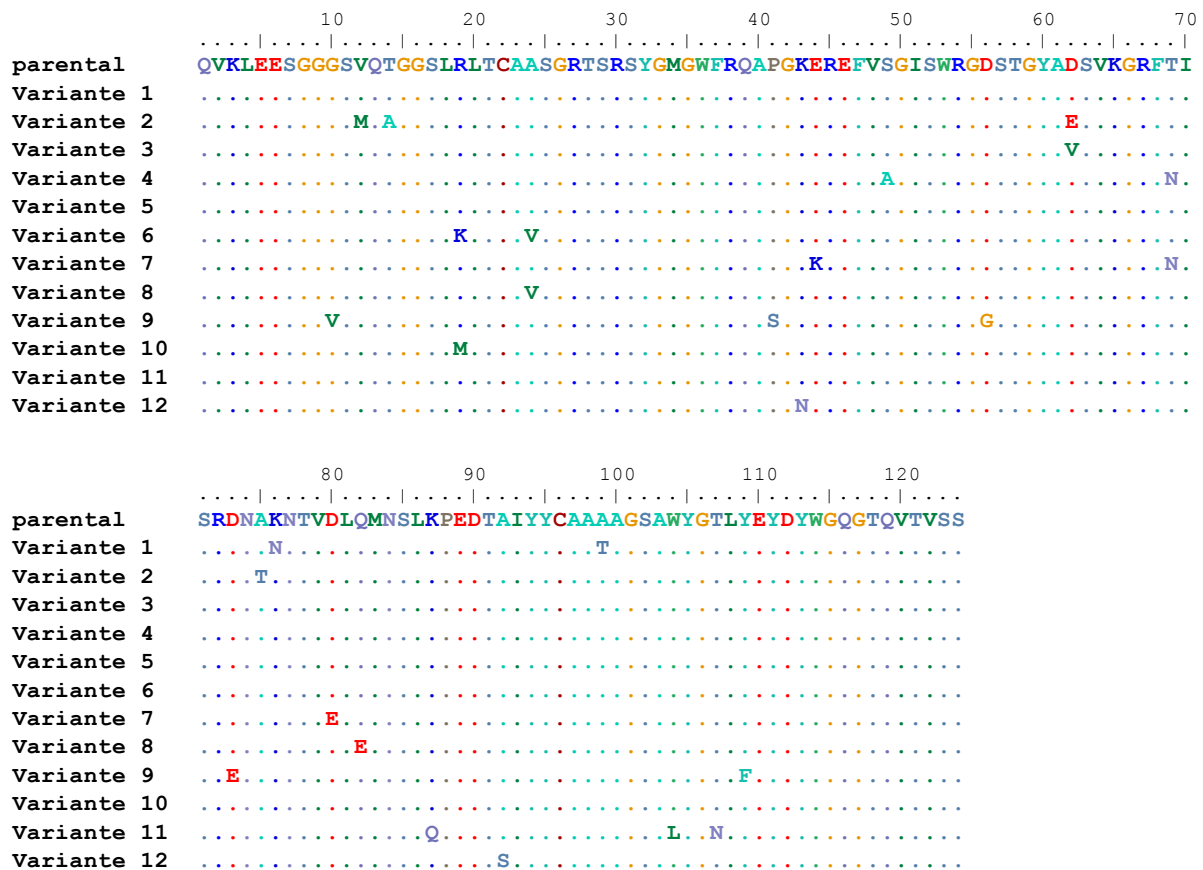


**Abb. 4.50:** (vorherige Seite) Markierung von EBY100 Zellen die die Bibliothek A auf der Oberfläche präsentieren mit mmEGFR (gelbe Fluoreszenz) und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (rote Fluoreszenz). **(A)** zeigt die Markierung der Oberflächen-präsentierten hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne, auf deren Sequenzgrundlage die Bibliothek geniert wurde. **(B)** zeigt die gleichen Zellen nur mit SA-PE markiert. A und B dienten zur Definition des Sortfensters M1. **(C)** zeigt die Messung der Bibliothek vor der ersten Sortierungsrunde. Nach der Sortierung von  $2,51 \times 10^5$  Zellen erfolgte in **(D)** die Resortierung. **(E)** zeigt die zweite Sortierungsrunde nach erneuter Anzucht der Zellen und Induktion der Oberflächenpräsentation. **(F)** zeigt die Fluoreszenzmarkierung und FACS-Analyse der Bibliothek vor der dritten Sortierungsrunde (R 3) und eine Anreicherung der Zellen im Sortfenster M2 auf 14,5%. **(G)** zeigt die Anreicherung nach der Sortierung auf 34,4% im Sortfenster M2. **(H)** zeigt die Resortierung von  $4,94 \times 10^4$ . **(I)** zeigt die Fluoreszenzmarkierung und FACS-Analyse der Bibliothek vor der vierten Sortierungsrunde (R4) mit 0,7% der Zellen innerhalb der Region M3. **(J)** zeigt die Messung der aus (I) sortierten Zellen und eine Anreicherung innerhalb des Sortfensters M3 auf 16,2%. **(K)** zeigt die Resortierung und Vereinzelung dieser Zellen unter Verwendung des Sortfensters M4 auf Selektivagarplatten.

Eine erste Anreicherung an vermeintlich mmEGFR-bindenden Zellen konnte während der ersten Sortierungsrunde (Runde 1) beobachtet werden (Abb. 4.50 D). Die Zellen wurden innerhalb von M1 von 0,1% auf 14,5% angereichert. Nach der Amplifizierung der sortierten R1-Zellen, erneuter Induktion der Oberflächenpräsentation und Fluoreszenzmarkierung der Zellen wurde diese Anreicherung in der nächsten Runde (R2) (Abb. 4.50 E) jedoch nicht mehr detektiert. Es waren wieder 0,1% der Zellen innerhalb der zur Sortierung verwendeten Markerregion lokalisiert (Abb. 4.50 E). Allerdings war bereits eine deutliche Zunahme des Fc-Fluoreszenzsignals zu erkennen, was auf eine verbesserte Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine hindeutete. Nach erneuter Anzucht und Induktion der Zellen war in Runde 3 eine weitere Anreicherung bezüglich mmEGFR-Bindung zu erkennen (Abb. 4.50 F). Durch die Resortierung konnten die in Runde 3 innerhalb von M2 lokalisierten Zellen von 14,5% auf 52,1% angereichert werden. Nach erneuter Anzucht und Induktion der Zellen wurde diese vermeintliche Anreicherung in Runde 4 nicht mehr detektiert. Hier konnten lediglich 0,7% der Zellen markiert werden. Das Fc-Fluoreszenzsignal war in dieser Runde weiter erhöht und überstieg sogar das rel. Fluoreszenzsignal für die Kontrolle A (Abb. 4.50 A).

Zur Charakterisierung der selektierten VHH-Varianten wurden 38 Einzelklone zur Herstellung von Expressionskulturen verwendet (Kapitel 3.1.13). Nach Induktion der Oberflächenpräsentation wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.15 mit 1  $\mu$ M b-mmEGFR, SA-PE und einem Fc-spezifischen F(ab')<sub>2</sub> Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) markiert und im FACS wie in Kapitel 3.1.17 beschrieben analysiert. Von diesen 38 Klonen zeigten 12 Klone eine schwache Bindung an mmEGFR (Daten nicht gezeigt). Zur näheren Charakterisierung wurde eine Sequenzanalyse der VHH-Domänen dieser Klone durchgeführt. Hier zeigte sich keine Anreicherung spezifischer Varianten, da nur Einzelsequenzen identifiziert wurden.

Zusätzlich wurde neben den mutierten VHH-Sequenzen auch die Sequenz der parentalen VHH-Domäne vorgefunden (Abb. 4.51 Variante 5). Allerdings konnten auch zwei Varianten identifiziert werden, die Mutationen innerhalb der CDR3 aufwiesen und eine weitere Variante die eine einzelne Mutation innerhalb von CDR1 aufwies. Die restlichen Varianten zeigten eine zufällige Verteilung der Mutationen über die *Framework* Bereiche 1 bis 3. In *Framework* 4 zeigte keine der analysierten Variante Mutationen (Abb. 4.51).



**Abb. 4.51: Sequenzanalyse der selektierten VHH-Varianten.**

Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der 12 gegen mmEGFR selektierten VHH-Varianten aus der Bibliothek A. Als *parental* ist die hsEGFR-spezifische VHH-Domäne bezeichnet, die zur Generierung der Bibliothek A verwendet wurde. Aminosäure-Substitutionen der Varianten 1 – 12 sind gekennzeichnet. Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen der IUPAC-Nomenklatur.

Um zu überprüfen, ob die mmEGFR-Bindung von den Proteinvarianten bestimmt war und aus diesem Grund genotypisch vermittelt wurde und spezifisch war, wurden die einzelnen Varianten zur Retransformation von EBY100 Zellen verwendet (Kapitel 3.1.8.1). Dies wurde in einer Co-Transformation mit dem Plasmid *pYD-ZZ* durchgeführt, um die Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine zu ermöglichen. Im Anschluss an die Selektion und Anzucht der Transformanten wurden Expressionskulturen der einzelnen VHH-Fc Varianten

hergestellt (Kapitel 3.1.13) und die Zellen mit b-mmEGFR ( $1\ \mu\text{M}$ ) und dem Fc-spezifischen  $\text{F(ab')}_2$  Fragment (AlexaFluor™ 647-Konjugat) aus der Ziege und SA-PE (1:10 verdünnt) markiert (Kapitel 3.1.15). Die Analyse der Fluoreszenz-markierten Zellen erfolgte anschließend mittels Durchflusszytometrie im MoFlo® Zyotmeter. Bei zwei der isolierten VHH-Varianten (Variante 4 und 8 in Abb. 4.51) konnte ein schwaches Fluoreszenzsignal für die Bindung von mmEGFR auch noch nach der Retransformation von EBY100 Zellen detektiert werden. Alle anderen Varianten ließen sich nach der Retransformation von EBY100 Zellen (*pYD-ZZ* Transformanten) auf der Zelloberfläche präsentieren und mit dem Fc-spezifischen Antikörper markieren, eine Spezifität für mmEGFR ließ sich jedoch nicht feststellen. Die Varianten (4) und (8) wurden im Anschluss löslich in APO-E Zellen produziert (Kapitel 3.1.13) und mittels Biolayer-Interferometrie (FortéBio) die Bindung an das Antigen mmEGFR untersucht (Kapitel 3.2.8). Zu diesem Zweck wurde die VHH-Varianten aus dem Überstand der Expressionskulturen mittels Protein A-Affinitätschromatographie (Kapitel 3.2.1) gereinigt und wie in Kapitel 3.2.2 in PBS umgepuffert. Die gereinigten VHH-Varianten wurden zur Beladung von Protein A-Biosensoren verwendet und die Bindung an die löslichen Antigen mmEGFR und hsEGFR analysiert. Durch die Analyse mittels Biolayer-Interferometrie konnte die Bindung an mmEGFR, die zuvor im FACS detektiert wurde, nicht mehr gemessen werden. Allerdings zeigten beide Varianten eine Bindung an hsEGFR. Exemplarisch ist in Abb. 4.52 die Bindung der Variante 4 an mmEGFR und hsEGFR gezeigt. Als Referenz wurde die parentale VHH-Variante (hsEGFR-spezifische VHH-Domäne), die spezifisch für hsEGFR war, ebenfalls löslich produziert und in gleicher Weise wie die beiden Varianten gereinigt und deren Bindung an hsEGFR und mmEGFR mittels Biolayer-Interferometrie analysiert (Abb. 4.53).

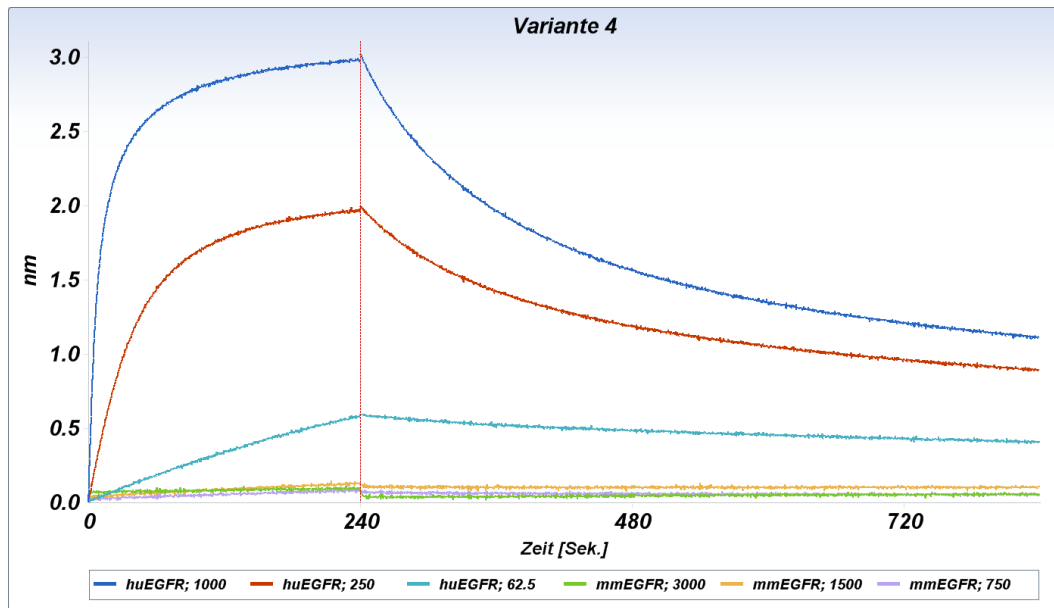


Abb. 4.52: Biolayer-Interferometrie Messung der VHH-Variante 4.

In den ersten 240 Sekunden ist die Assoziation der an Protein A-Biosensoren immobilisierten VHH-Variante 4 mit verschiedenen Konzentrationen der löslichen Antigene hEGFR und mmEGFR gezeigt (s. Legende). Im Anschluss daran ist die Dissoziation der Bindungskomplexe für 600 Sekunden in PBS dargestellt.

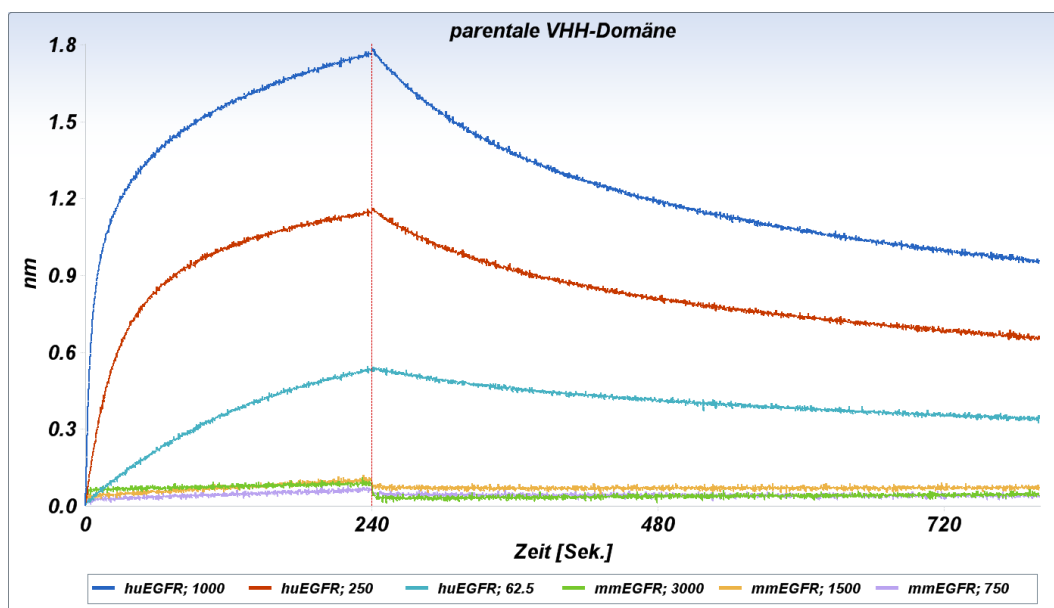


Abb. 4.53: Biolayer-Interferometrie Messung der parentalen VHH-Domäne.

In den ersten 240 Sekunden ist die Assoziation der an Protein A-Biosensoren immobilisierten parentalen VHH-Domäne mit verschiedenen Konzentrationen der löslichen Antigene hEGFR und mmEGFR gezeigt (s. Legende). Im Anschluss daran ist die Dissoziation der Bindungskomplexe für 600 Sekunden in PBS dargestellt.

Keine der beiden selektierten VHH-Varianten zeigte eine spezifische Bindung an mmEGFR (Variante 4, Abb. 4.52). Dieser Befund war auch für die parentale VHH-Domäne zu erkennen; allerdings war von dieser schon im Vorfeld bekannt, dass sie keine Spezifität für mmEGFR aufwies. Abschließend kann festgehalten werden, dass die Durchmusterung der Bibliothek A nicht zu einer Anreicherung von mmEGFR-spezifischen VHH-Varianten geführt hat. Die Analyse der Einzelklone zeigte zwar im Falle der Oberflächenpräsentation auf Hefezellen eine schwache Bindung an mmEGFR, diese konnte jedoch nach löslicher Produktion von zwei präferierten VHH-Varianten nicht mehr detektiert werden. Allerdings zeigten beide Varianten eine verbleibende Spezifität für das Antigen hsEGFR. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass über die einzelnen Selektionsrunden (R1 bis R4) ein kontinuierlicher Anstieg des Fluoreszenzsignal für die Oberflächenpräsentation (rel. Fluoreszenz rot) erfolgte, was auf eine erfolgreiche Anreicherung von Zellen hindeutet, die eine im Vergleich zur ersten Selektionsrunde (R1) erhöhte Oberflächenpräsentation des VHH-Fc Fusionsproteins zeigten (Abb. 4.50).

---

## 5 Diskussion

---

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung und Erprobung eines Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von Fc-Fusionsproteinen und IgG-Molekülen auf Hefezellen. Im Gegensatz zur kovalenten Oberflächenpräsentation<sup>92</sup> auf Hefezellen wird das zu präsentierende Protein in dem hier vorgestellten Verfahren über seinen Fc-Teil von der Fc-bindenden ZZ-Domäne auf der Zelloberfläche verankert. Die ZZ-Domäne ist zu diesem Zweck als Aga2p-Fusionsprotein kovalent auf der Zelloberfläche verankert. Durch die Regulation der Expression der ZZ-Domäne besteht die Möglichkeit, zwischen Oberflächenpräsentation und löslicher Sekretion selektiv zu schalten. Da die Interaktion zwischen ZZ-Domäne und Fc-Teil reversibel und pH-abhängig<sup>67</sup> ist, muss das System dem Anspruch einer stabilen Genotyp-Phänotyp-Kopplung genügen, welche die Voraussetzung für eine erfolgreiche Anwendung des Systems als Methode zur Selektion ist.

---

### 5.1 Oberflächenpräsentation der Fc-Bindedomäne

---

Das Protein A (SpA) aus *S. aureus* bindet hoch-affin an Fc-Teile diverser IgG-Moleküle. SpA besteht aus fünf Domänen (A, B, C, D und E), die auch einzeln Fc-Teile binden können<sup>63</sup>. Die Faltung von Domäne B ist exemplarisch für alle SpA-Domänen. Sie besteht aus zwei antiparallelen  $\alpha$ -Helices und einer leicht gedrehten dritten  $\alpha$ -Helix. Wie Co-Kristallisationsexperimente zeigten, ist Helix 3 aber nicht direkt an der Fc-Bindung beteiligt<sup>64</sup>. Als Fc-Bindedomäne wurde in der vorliegenden Arbeit die von Domäne B abgeleitete Z-Domäne verwendet, von welcher bekannt ist, dass auch sie Fc-Teile von humanen Antikörpermolekülen mit hoher Affinität bindet<sup>149</sup>. Die Z-Domäne wurde von Nilsson und Mitarbeitern 1987 durch eine artifizielle Aminosäuresubstitution in Domäne B, Glycin zu Alanin an Position 29, generiert und zeigt eine verbesserte Stabilität im Vergleich zur Domäne B<sup>67</sup>. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die ZZ-Domäne verwendet, bei welcher es sich um eine duplizierte Z-Sequenz handelt. Ihr wird laut Literatur eine im Vergleich zur Z-Domäne deutlich erhöhte Affinität für Fc-Teile zugeschrieben<sup>144, 150</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl Z- als auch ZZ-Domäne durch die Fusion mit dem Zellwandprotein Aga2p kovalent auf Hefezellen präsentiert werden. Die korrekte Faltung beider Domänen wurde durch die Bindung eines IgG-Moleküls (Cetuximab) und der anschließenden Zugabe von Fluoreszenz-markiertem Antigen (b-hsEGFR) und SA-PE im FACS nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigten wie erwartet eine höhere Affinität der ZZ als der Z-Domäne für Fc-Teile, da die ZZ-präsentierenden Zellen unter gleichen Bedingungen stärker Fluoreszenz-markiert

werden konnten. Dieser Befund kann mit einem Aviditätseffekt erklärt werden, da die ZZ-Domäne ein divalentes Molekül ist, während die Z-Domäne monovalent ist<sup>67</sup>. Im Fc-Teil sind zwei potentielle Bindestellen für SpA vorhanden, je eine pro schwerer Kette. Das ist auch der Grund dafür, dass das stöchiometrische Bindungsverhältnis von SpA zu IgG im Verhältnis 1:2 vorliegt<sup>63</sup>. Protein A hat eine fünf-Domänenstruktur, die aber funktionell divalent ist<sup>151-153</sup>. Die simultane Bindung der vier für Fc hoch-affinen SpA-Domänen erklärt den Anstieg der apparenten Affinität bei der Kombination mehrerer einzelner SpA Domänen<sup>68, 144</sup>. Es wird angenommen, dass die ZZ-Domäne beide Bindestellen am Fc-Teil erreicht, was auch den Befund der stärkeren Bindung der ZZ-Domäne an Fc gegenüber der Z-Domäne erklären würde<sup>144, 150</sup>. Allerdings gibt es Hinweise, dass die simultane Bindung beider Bindestellen am Fc-Teil eine Zerstörung der  $\alpha$ -helikalen Struktur der Domäne voraussetzen würde, wodurch keine Fc-Bindung mehr möglich wäre<sup>70</sup>. Deshalb wird vielmehr davon ausgegangen, dass eine Z-Domäne des divalenten Konstrukts die Bindung an Fc vermittelt, während die nicht an der Bindung beteiligte Z-Domäne durch eine schwache Interaktion mit der gebundenen Z-Domäne oder der zweiten Bindestelle einen Aviditätseffekt vermittelt und zu einer verringerten  $K_{\text{off}}$  führt<sup>71, 144</sup>, denn durch die Dissoziation einer Z-Domäne ist die Bindung der anderen Z-Domäne ermöglicht. Das erklärt auch die Tatsache, dass Z- und ZZ-Domäne ähnliche Affinitätskonstanten für die Bindung von Fc haben<sup>144</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde für die divalente ZZ-Domäne ein im Vergleich zur monovalenten Z-Domäne stärkeres Fluoreszenzsignal durch die Markierung mit einem IgG-Molekül gemessen. Dieser Befund wird vermutlich nicht durch das Einfangen einer größeren Anzahl an IgG-Molekülen auf der Zelle hervorgerufen, da eine ZZ-Domäne wie auch eine Z-Domäne lediglich ein IgG-Molekül bindet. In beiden Fällen liegt folglich ein Verhältnis von 1:1 vor. Aus diesem Grund wird vermutet, dass allein die stärkere Bindung der ZZ-Domäne an Fc zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führte.

Im Zusammenhang mit dem Thema der hier vorgestellten Arbeit ist bereits gezeigt worden, dass die Z-Domäne zur Immobilisierung von Antikörpern auf *E. coli* Zellen<sup>154, 155</sup> und Viren<sup>156, 157</sup> eingesetzt werden kann. Auch dienten ZZ-präsentierende Hefezellen bereits als Immunadsorbent zur Detektion von Antikörpern aus Serumproben<sup>158</sup>. Des Weiteren konnte die ZZ-Domäne als  $\alpha$ -Agglutinin-Fusion auf der Oberfläche von Hefezellen präsentiert und durch die Co-Kultivierung mit Zellen, die Fc-EGFP sekretierten, Fluoreszenz-markiert werden<sup>159</sup>.

## 5.2 Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen

Die ZZ-präsentierenden Zellen konnten zusätzlich zur Markierung durch die externe Zugabe eines IgG-Moleküls (Cetuximab) auch noch mit einem endogen sekretierten VHH-Fc Fusionsprotein markiert werden. Dadurch wurde die Fähigkeit des Verfahrens zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen gezeigt. VHH-Fc und ZZ wurden zu diesem Zweck in einer Zelle co-exprimiert. Durch die Bindung des Fc-Teils an die ZZ-Domäne erfolgte das Einfangen des löslich sekretierten VHH-Fc Fusionsproteins auf der Zelle und die Markierung über die Zugabe von Antigen. In diesem Fall wurden im Vergleich zur Markierung mit Cetuximab deutlich geringere Fluoreszenzintensitäten im FACS detektiert was auf eine ineffizientere Markierung der ZZ-Domäne mit endogen sekretiertem VHH-Fc hindeutet. Dieser Befund deutet auch darauf hin, dass die auf der Zelloberfläche präsentierten ZZ-Domänen nicht mit VHH-Fc abgesättigt und dass noch freie ZZ-Domänen vorhanden waren. Eine Begründung könnte eine ineffizientere Sekretion des VHH-Fc Proteins im Gegensatz zur ZZ-Domäne oder ein Ungleichgewicht der Sekretion beider Proteine sein. Die Expression beider Gene (ZZ und VHH-Fc) wurde durch den Gal1-Promotor reguliert. Deshalb könnte für beide Gene ein ähnlich hohes Expressionslevel erwartet werden. Allerdings sind limitierende Schritte bei der Expression von Fremd-Genen in *S. cerevisiae* bekannt. Hier sei beispielhaft darauf verwiesen, dass unter Verwendung des gleichen Promotors Hefe-eigene Gene stärker exprimiert werden als Fremd-Gene<sup>141</sup>. Begründet ist dieser Umstand mit dem Effekt der *Codon Usage* auf die translationale Elongation. Trotz der Redundanz des genetischen Kodes werden bestimmte Kodone während der Translation bevorzugt, da nicht alle tRNAs und Aminoacyl-tRNAs in gleicher Weise vorhanden sind. Zudem unterscheidet sich die *Codon Usage* stark zwischen verschiedenen Organismen<sup>141</sup>. Die Sequenz der VHH-Fc Fusion wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bezüglich der *Codon Usage* von *S. cerevisiae* optimiert und stellt demnach ein mögliches Problem während der Translation dar. Dadurch könnte erklärt werden, warum die VHH-Fc Sekretion vermindert war.

Ein weiterer Grund für die unterschiedliche Sekretion beider Proteine kann post-translational vermutet werden. Die ZZ-Domäne ist im Vergleich zum VHH-Fc Fusionsprotein ein kleines Protein, was ohne Disulfidbrücken effektiv funktionell faltet und sekretiert wird. Aufgrund ihrer guten Sekretions- und Faltungseigenschaften wird die ZZ-Domäne häufig als Fusion mit Proteinen hergestellt, die eine schlechte Sekretion zeigen<sup>160, 161</sup>. Die Faltung des VHH-Fc Fusionsproteins hingegen erfordert die korrekte Ausbildung von mindestens drei Disulfidbrücken, die in der *Hinge*-Region lokalisiert sind. Die Bedeutung der korrekten Disulfidverbrückung für die erfolgreiche lösliche Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins ist im



folgenden Abschnitt erläutert. Zu diesem Zweck wurde die Sekretionsleistung des PDI (*protein disulfide isomerase*)-überexprimierenden Hefestammes (APO-E) mit dem Stamm EBY100 verglichen, der die PDI nicht überexprimiert.

---

### 5.3 Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen

---

Zur Verbesserung der Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen wurden zwei Hefestämme hergestellt. Durch genetische Manipulation wurde bei diesen Stämmen (APO-E und APO-B) im Vergleich zu den Hefestämmen, aus denen sie hervorgegangen sind (EBY100 und BJ5464), die konstitutive Überexpression der ER-lokalisierten Oxidoreduktase PDI erreicht. Für den Stamm APO-E wurde im Vergleich zum Ausgangsstamm EBY100 eine doppelt so hohe Proteinkonzentration im Überstand von VHH-Fc Expressionskulturen gemessen. Dieser Befund untermauert bereits publizierte Ergebnisse, dass sich die PDI-Überexpression vorteilhaft auf die lösliche Sekretion des Proteins auswirkt<sup>162</sup>. Die PDI katalysiert bekanntermaßen die Oxidation und Reduktion von Disulfidbrücken während der Faltung von Proteinen im ER der Hefezelle. Das ist ein entscheidender Schritt im Sekretionsweg der Zelle, da die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken ausschlaggebend für die strukturelle Stabilität von Proteinen, wie z.B. des hier verwendeten VHH-Fc Fusionsproteins, ist. Durch den intrazellulären Qualitätskontrollmechanismus wird sichergestellt, dass nur korrekt gefaltete Proteine sekretiert werden. Falsch gefaltete Proteine exponieren z.B. hydrophobe Aminosäurebereiche und führen dadurch zur Induktion der UPR (*Unfolded Protein Response*). Diese Proteine werden dann von weiteren ER-lokalisierten Chaperonen, wie z.B. BiP gebunden, was im Anschluss nicht zur Sekretion, sondern unter anderem zum Abbau der Proteine mittels ERAD (*ER-associated Degradation*) führt<sup>115</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde vermutlich die korrekte Faltung der VHH-Fc Proteine durch die Überexpression der PDI erleichtert, wodurch eine größere Proteinmenge sekretiert werden konnte, da intrazellulär ein größerer Anteil an richtig gefaltetem Protein vorlag. Allerdings sind aus der Literatur deutlich größere und effizientere Sekretionssteigerungen durch die Überexpression der PDI gezeigt worden<sup>111</sup>. Rakestraw und Mitarbeiter zeigten z.B. eine 180-fache Steigerung der Sekretion eines vollständigen IgG-Moleküls durch die Verwendung eines PDI-überexprimierenden Hefestammes und der sekretorischen Sequenz app8<sup>111</sup>. Diese Sekretionseffizienz wurden in der vorliegenden Arbeit auch in Kombination mit der sekretorischen Sequenz app8 nicht erzielt. Vermutlich ist die verbesserte Sekretion durch die Überexpression der PDI abhängig vom jeweils sekretierten Protein<sup>117</sup> und es wäre zweckmäßig zu klären, ob die Überexpression anderer Chaperone zu

einer weiteren Steigerung der VHH-Fc Sekretion führen könnte. Des Weiteren ist bekannt, dass die PDI *de novo* Disulfidbrücken von dem ebenfalls ER-lokalisierten Enzym Ero1p erhält, welche sie im Anschluss direkt zur Oxidation von Disulfidbrücken im Substratprotein verwendet<sup>163</sup>. So gesehen ist Ero1p für das Recycling der PDI zuständig, indem es die PDI vom reduzierten in den oxidierten Zustand überführt. Aus diesem Grund wäre es vermutlich vorteilhaft, Ero1p in gleichem Maße wie die PDI überzuexprimieren. Durch ein ausbalanciertes Expressionslevel von Ero1p und PDI können reduzierte PDI-Moleküle schneller wieder oxidiert werden, um neue Disulfidbrücken im Substratprotein zu oxidieren.

---

#### 5.4 Optimierung der Oberflächenpräsentation und Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen

---

Zusätzlich zur Überexpression der PDI zeigten auch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Verbesserung der löslichen Sekretion von VHH-Fc Fusionsproteinen und deren Oberflächenpräsentation. Im Folgenden ist deshalb der Einfluss der Expressionsbedingungen auf Oberflächenpräsentation und Sekretion und der Einfluss der Gendosis auf die Sekretion diskutiert. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurden kommerziell erhältliche synthetische Minimalmedien (Clontech) zur Kultivierung und Oberflächenpräsentation verwendet. Diese Medien wiesen einen leicht sauren pH-Wert auf (pH 5,8) und lagen ungepuffert vor. Während der Kultivierung von Hefezellen in synthetischem Minimalmedium wurde eine weitere Ansäuerung beobachtet, was vermutlich durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte der Hefe verursacht wurde. Analog dazu wurde bei Übernachtskulturen ein pH-Wert von ca. 3 gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Verwendung dieser Medien erwies sich, vor dem Hintergrund der pH-abhängigen ZZ:Fc-Interaktion als unvorteilhaft, denn durch die Erniedrigung des pH-Wertes wird die Bindung von der ZZ-Domäne zum Fc-Teil schwächer<sup>164</sup>. Unter Verwendung dieser Medien konnte die Oberflächenpräsentation des VHH-Fc nicht nachgewiesen werden, da die Interaktion von Z-Domäne und Fc-Teil laut Literatur ab pH 3,3 nicht mehr besteht<sup>67</sup>. Durch den anschließenden Gebrauch von gepuffertem Minimalmedium Medium (pH 7,0) wurde der pH-Wert über einen ausreichend langen Kultivierungszeitraum stabilisiert und die Ausbildung der Bindung zwischen ZZ-Domäne und VHH-Fc ermöglicht. In diesem Fall konnte das VHH-Fc Fusionsprotein auf der Zelle über die Interaktion mit dem Antigen markiert und dadurch im FACS detektiert werden. Allerdings wurde eine im Vergleich zur Negativkontrolle nur gering erhöhte Fluoreszenzintensität gemessen. Außerdem waren die Fluoreszenzintensitäten 40-fach geringer als bei der Markierung von ZZ-präsentierenden Zellen mit extern zugegebenem IgG.

---

Das deutet, wie bereits erwähnt, auf eine weniger effiziente Expression der VHH-Fc Fusion oder Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins hin. Gestützt wurde diese Vermutung durch den Umstand, dass die ZZ-Domäne zur gleichen Zeit mit deutlich höherer Effizienz auf der Zelloberfläche präsentiert wurde und so viele ZZ-Domänen unbesetzt waren, denn die ZZ-Domäne konnte mit einem Protein A-spezifischen Nachweisantikörper auf der Zelloberfläche deutlich stärker markiert werden. Eine signifikante Verstärkung des Fluoreszenzsignals für die Oberflächenpräsentation des VHH-Fc Fusionsproteins wurde erst durch den Zusatz von 11% (w/v) PEG8000 zum Kulturmedium erreicht. Das Fluoreszenzsignal für die ZZ-Domäne war jedoch mit und ohne PEG-Zusatz gleichbleibend stark. Daraus lässt sich schließen, dass PEG8000 einen positiven Einfluss auf die Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins hatte. Diese Vermutung wurde durch weitere Experimente bestätigt, die im Folgenden diskutiert werden.

Die Analyse des Überstandes von VHH-Fc Expressionskulturen mit und ohne PEG8000 zeigte, dass das VHH-Fc Fusionsprotein durch den Zusatz von PEG8000 sehr viel effizienter sekretiert wurde, da im Kulturmedium signifikant höhere Proteinkonzentrationen detektiert wurden. Die Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in das Kulturmedium erfordert einen intrazellulären Transport des Proteins über die Zellmembran. Der klassische sekretorische Weg von Proteinen führt bei *S. cerevisiae* co- und/oder post-translational in das endoplasmatische Retikulum, von dort in den Golgi-Apparat und ausgehend von diesem über Transportvesikel zur Zellmembran<sup>165</sup>. Die extrazelluläre Sekretion erfolgt im Anschluss mittels Exocytose durch die Fusion der Transportvesikel mit der Zellmembran und das Entlassen des Vesikelinhaltes in den Kulturüberstand. Es ist möglich, dass PEG8000 die Vesikelfusion mit der Zellmembran erleichtert und so die Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins verbessert. Es wurde bereits gezeigt, dass PEG zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität und die Fluiditätseigenschaften von Membrankomponenten verändert<sup>166</sup>. Das kann aus der direkten Interaktion von PEG mit der Lipiddoppelschicht und deren daraus resultierender Destabilisierung erfolgen. Aus diesem Grund wird PEG auch routinemäßig zur Zellfusion während der Hybridomproduktion verwendet und allgemein als „Fusogen“ bezeichnet<sup>167</sup>. Der Einfluss von PEG kann aber auch indirekter Natur sein, indem es die polaren Eigenschaften des umgebenden wässrigen Mediums beeinflusst und dadurch zu einer Verminderung der Membranstabilität führt. Dieser Effekt kann über eine Dehydrierung der polaren Kopfgruppen der Lipiddoppelschicht durch das stark hydrophile PEG im umgebenden Medium erklärt werden<sup>168</sup>. Über den genauen Mechanismus der durch PEG verbesserten VHH-Fc Sekretion kann hier nur spekuliert werden. Interessanterweise war die Sekretionseffizienz stark abhängig vom Molekulargewicht des verwendeten PEGs. Mit hoch-molekularem PEG8000

wurde eine signifikant größere Proteinmenge im Kulturmedium detektiert als mit PEG1500. Vermutlich korreliert das Molekulargewicht des verwendeten PEGs direkt mit der möglichen Interaktion von PEG mit der Zellmembran. Uma Maheswar Rao und Satyanarayana verdeutlichen ebenfalls den Einfluss des Molekulargewichts von PEG auf die Sekretion. Sie zeigten eine verbesserte Sekretion von  $\alpha$ -Amylase aus *Geobacillus thermoleovorans* in Gegenwart von PEG8000 im Vergleich zu PEGs mit geringeren Molekulargewichten<sup>140</sup>. Das stärkere Fluoreszenzsignal für Oberflächen-präsentierte VHH-Fc Fusionsproteine in Gegenwart von PEG8000 kann zusätzlich zur bereits beschriebenen gesteigerten Sekretion und der dadurch verursachten höheren Besetzungsrate der ZZ-Domänen auf der Zelloberfläche auch noch durch eine verminderte Dissoziation des Fc-Teils von der ZZ-Domäne durch die erhöhte Viskosität des Mediums erklärt werden. In diesem Fall ist die Diffusion dissoziierter VHH-Fc Fusionsproteine durch die hohe Viskosität des Mediums vermindert und die Assoziation von ZZ und Fc erleichtert. Die erreichten Zelldichten während der Kultivierung in PEG8000-haltigem Medium deuten darauf hin, dass PEG keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Kultur hatte, obwohl mit einem verminderten Sauerstoffeintrag durch die hohe Viskosität des Mediums gerechnet wurde. Dennoch wurden mit und ohne PEG vergleichbar hohe Zelldichten während der Kultivierung erreicht wurden (Daten nicht gezeigt).

Die VHH-Fc Gendosis innerhalb der Hefezelle ist u.a. abhängig von der Kopienzahl des Plasmids. Durch eine Steigerung der Plasmidkopienzahl wurde eine erhöhte Syntheserate des VHH-Fc Fusionsproteins erwartet. Da in den bisher diskutierten Ergebnissen CEN6/ARS4-basierte Plasmide, die sich durch eine geringe Kopienzahl in der Zelle auszeichnen, verwendet wurden, wurde vermutet, dass die Verwendung eines 2-micron-basierten Plasmids zu einer erhöhten Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins führen könnte. Diese Plasmide zeichnen sich durch eine bis zu 100fach erhöhte Kopienzahl in der Zelle aus<sup>139</sup>. Zu diesem Zweck wurden VHH-Fc Expressionskulturen zur löslichen Sekretion hergestellt, die sich bezüglich ihrer Plasmidkopienzahl unterschieden. Interessanterweise wurde gegen alle Erwartungen eine geringere Proteinsekretion vom 2-micron-basierten Plasmid gemessen und die Expression der VHH-Fc Gensequenz von dem CEN6/ARS4-basierten Plasmids resultierte in einer effizienteren Sekretion des Proteins in den Kulturüberstand. Des Weiteren war zu beobachten, dass unter Verwendung des 2-micron Plasmids eine im Vergleich zum CEN6/ARS4 Plasmid erhöhte intrazelluläre Konzentration des nicht-prozessierten VHH-Fc Fusionsproteins vorhanden war. Da das verwendete pre-pro Signalpeptid app8 ein Molekulargewicht von 8,7 kD hat, ließen sich die intrazellulären Formen (prozessiert und nicht-prozessiert) des VHH-Fc Fusions-

---

proteins in Western-Blot Analysen unterscheiden. Das reife VHH-Fc Fusionsprotein war nach Entfernung des Signalpeptids durch sein geringeres Molekulargewicht gut von der unprozessierten Form zu unterscheiden und beide Proteinformen konnten im Zelllysate immunologisch detektiert werden. Lediglich bei der Verwendung des 2-micron Plasmids wurde die unprozessierte Proteinform nachgewiesen. Dieser Befund deutet auf eine weniger effiziente Entfernung des Signalpeptids durch die intrazellulären Proteasen hin. Es ist möglich, dass erhöhte Transkriptlevel und daraus resultierende größere Proteinmengen die korrekte Prozessierung des Proteins limitierten. Für das Entfernen des pre-pro Signalpeptids sind zwei intrazelluläre Proteasen zuständig. Die ersten 19 Aminosäuren der pre-Region werden von einer ER-lokalisierten Signalpeptidase geschnitten. Nach der Passage des Proteins im ER und dessen Transport zum Golgi-Apparat ist in späten Golgi-Kompartimenten die Protease Kex2p für die Entfernung der pro-Region zuständig<sup>141</sup>. Die pro-Region umfasst weitere 64 Aminosäuren. Es kann vermutet werden, dass die Protease Kex2p der limitierende Schritt in der Prozessierung des Proteins war, da sie die deutlich größere pro-Region des Signalpeptids entfernt.

Allgemein kann gesagt werden, dass die Überexpression und Sekretion heterologer Proteine immer eine Stresssituation für die Hefezelle darstellt<sup>117</sup>. Vermutlich führte die hohe Kopienzahl zu einem erhöhten Transkriptlevel und so zu einer Stressantwort der Hefezelle. Dadurch könnte die Sekretion behindert werden, da durch die Akkumulation von Intermediaten und falsch gefalteten Proteinen stressbedingt der Mechanismus der UPR induziert werden könnte. Dieser würde anstatt zur Sekretion zum proteolytischen Abbau des Proteins führen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Limitierung von Energie und Ressourcen zur Proteinsynthese, die bei hohen Transkriptleveln vor allem bei *E. coli* zu beobachten sind<sup>169, 170</sup>. Ferner kann aber auch die Translokation des Proteins, wie erwähnt die Prozessierung des Signalpeptids und die Faltung des Proteins im ER limitierend auf die Sekretion wirken. Obwohl der Befund der reduzierten Sekretion durch eine Erhöhung der Gendosis nicht vollständig geklärt werden konnte, wurde zur weiteren Sekretion das CEN6/ARS4-basierte Plasmid verwendet.

## 5.5 Funktionalität von Hefe-produzierten VHH-Fc Fusionsproteinen

Die Funktionalität des VHH-Fc Fusionsproteins wurde sowohl auf der Zelle während der Oberflächenpräsentation, als auch löslich im Kulturüberstand untersucht. Für die erfolgreiche Verwendung des nicht-kovalenten Verfahrens zur Selektion und zur Charakterisierung von VHH-Fc Fusionsproteinen war es erforderlich, dass das Protein sowohl auf der Zelle als auch im Kulturüberstand funktionell vorlag. Die Funktionalität wird im Allgemeinen durch die korrekte Glykosylierung und Faltung des Proteins bestimmt.

Über die Bindung des spezifischen Antigens wurde die Funktionalität des Oberflächen-präsentierten Proteins nachgewiesen. Über einen Zeitraum von 72 Stunden konnte das VHH-Fc Fusionsprotein auf der Zelle durch die Bindung an das Antigen hEGFR markiert und im FACS erfolgreich detektiert werden. Im Vergleich zu den SpA-Domänen A bis E binden Z- und ZZ-Domäne IgG-Moleküle nur über den Fc-Teil<sup>64</sup>. Für die Domänen A bis E hingegen weisen IgG-Moleküle eine weitere mögliche Bindestelle auf, die im Fab-Fragment lokalisiert ist. Diese Bindung erfolgt größtenteils über hydrophile Aminosäurereste des Fab-Fragments. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass Protein A *Framework*-Bereiche von VHH-Domänen bindet<sup>171</sup>. Durch die Interaktion von SpA oder dessen Domänen mit dem Fab-Fragment eines Antikörpers oder der VHH-Domäne könnte es zu einer zum Antigen konkurrierenden Bindung kommen, wodurch die Antigenbindung beeinträchtigt werden könnte. Durch die Verwendung der ZZ-Domäne zur Oberflächenpräsentation ist sichergestellt, dass die Bindung von VHH-Fc Fusionsproteinen und IgG-Molekülen ausschließlich über den Fc-Teil erfolgt und so nicht die Bindung an das Antigen behindert wird. Durch die Bindung des Fc-Teils ist darüber hinaus eine günstige Ausrichtung und Exponierung der Oberflächen-präsentierten Proteine möglich. Die Hefezelle hat eine ca. 200 nm starke Zellwand außerhalb der Plasmamembran, die dicht mit Hefe-eigenen Zellwandproteinen besetzt ist<sup>172</sup>. Durch die Verwendung des Aga1p-Aga2p Protein-komplexes zur Oberflächenverankerung der ZZ-Domäne wird diese ausreichend weit in der extrazellulären Umgebung exponiert, um die Bindung an z.B. VHH-Fc Fusionsproteine zu ermöglichen. Des Weiteren werden durch die Bindung des Fc-Teils, wie erwähnt, die beiden VHH-Domänen des homodimeren VHH-Fc Fusionsproteins weiter von der Zelle entfernt präsentiert und so exponiert, dass eine ungehinderte Interaktion mit dem Antigen möglich ist. Es ist bekannt, dass kurze Ankerproteine, wie z.B. verkürzte Formen des Proteins Flo1p, nicht ausreichend in die extrazelluläre Umgebung der Zelle hineinreichen und Oberflächen-präsentierte Proteine aus diesem Grund nicht in gewünschter Weise detektiert werden können, da die Interaktion mit dem Antigen oder mit Nachweisantikörpern sterisch durch die

Zellwand behindert ist<sup>94</sup>. Die Verwendung einer verlängerten Flo1p-Form ermöglicht hingegen die Detektion.

Im Hinblick auf die weitere Untersuchung der Funktionalität des VHH-Fc Fusionsprotein innerhalb des nicht-kovalenten Systems wurden Expressionskulturen zur löslichen Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand hergestellt. Die Bewertung der Funktionalität erfolgte über die Bestimmung der kinetischen Konstanten der biomolekularen Interaktion des Proteins und des Antigens hsEGFR. Zu diesem Zweck wurde das Protein aus dem Kulturüberstand mittels Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt und zur Bindungsanalyse mittels Biolayer-Interferometrie verwendet. Durch zuvor durchgeführte Messungen mit dem VHH-Fc Fusionsprotein aus einer HEK293-Expressionskultur waren die kinetischen Konstanten der Bindung zu hsEGFR bekannt (Daten nicht gezeigt). Sowohl für das Hefe- als auch für das HEK293-produzierte Protein wurden vergleichbare Messwerte erzielt, die in einem  $K_D$ -Bereich von 9 nM bis 90 nM lagen. Da zur HEK293-Expression im Gegensatz zur Hefeexpression eine N-terminale Fc-Fusion der VHH-Domäne (C-Terminus des Fc-Teils am N-Terminus der VHH-Domäne) verwendet wurde, können die unterschiedlichen  $K_D$ -Werte durch die Art der Fc-Fusion erklärt werden. Die Antigenbindung der VHH-Domäne erfolgt über die N-terminalen Bereiche der Domäne. Dort sind die drei CDRs lokalisiert, die das Paratop bilden und so die Bindung an das Antigen vermitteln<sup>173</sup>. In der zur HEK293-Expression verwendeten Gensequenz war der 5'-Bereich des VHH-Gens mit der Sequenz für den Fc-Teil fusioniert. Es ist möglich, dass dadurch eine Reduzierung der Affinität für das Antigen hervorgerufen wurde, was sich in der Biolayer-Interferometrie-Messung durch einen höheren  $K_D$ -Wert zeigte. Es wurde vermutet, dass die C-terminale Fusion der VHH-Domäne mit dem Fc-Teil (N-Terminus des Fc-Teils am C-Terminus der VHH-Domäne) nicht zu einer Beeinträchtigung der Bindung des Antigens führte, da im Vergleich zur N-terminalen Fc-Fusion ein niedrigerer  $K_D$ -Wert für die Antigenbindung gemessen wurde. Dieser Befund ist plausibel, da auch in natürlich auftretenden *Heavy-chain*-Antikörpern die VHH-Domäne über ihren C-Terminus über die *Hinge*-Region mit dem Fc-Teil verbunden ist. Da die Antigenbindung, wie erwähnt, über den N-Terminus der VHH-Domäne und den dort lokalisierten CDRs vermittelt wird, sind diese für die Interaktion mit dem Antigen durch die Fc-Fusion nicht beeinträchtigt und frei zugänglich. Hier sei beispielhaft auf die VHH-Fc Fusion ART621 (Arana Therapeutic Ltd.) verwiesen, dass sich in der klinischen Erprobung zur Behandlung der Psoriasis befindet<sup>174</sup>.

Des Weiteren konnte in Western-Blot Analysen festgestellt werden, dass die Dimerisierung des VHH-Fc Fusionsproteins erfolgreich war. Die Dimerisierung wird durch die korrekte Faltung der schweren Ketten des Fc-Teils und die Ausbildung von Disulfidbrücken ermöglicht. Dies



wurde vermutlich durch die Mutagenese der N-Glykosilierungsstelle des Fc-Teils zu Beginn der vorliegenden Arbeit erleichtert. Zu diesem Zweck wurde das Kodon für die Aminosäure Asparagin (N) an Position 297 gegen das Kodon für die Aminosäure Glutamin (Q) substituiert und so die von *S. cerevisiae* bekannte Hypermannosylierung<sup>175</sup> während der N- Glykosylierung von Proteinen verhindert. Die hohe Anzahl an Mannoseresten könnten andernfalls die Fc-Dimerisierung sterisch behindern wodurch hydrophobe Kontaktflächen zwischen den Ketten im ER exponiert würden. Das würde eine Stressantwort der Zelle induzieren und eine Beeinträchtigung der Sekretion des Proteins zu Folge haben. Die Funktionalität des Fc-Teils konnte weiterhin während der Biolayer-Interferometrie gezeigt werden, da Protein A-Sensoren erfolgreich mit dem VHH-Fc Fusionsprotein beladen werden konnten.

Unter natürlichen Bedingungen sind humane IgG-Moleküle an Position 297 glykosyliert. Es wurde beobachtet, dass die humane Glykosylierung dieser Position zur Stabilisierung der CH2-Domäne beiträgt und sich deshalb positiv auf die Dimerisierung des Fc-Teils von IgG-Molekülen auswirkt<sup>176</sup>.

---

## 5.6 Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen

---

Die vielseitige Anwendung des in dieser Arbeit etablierten Verfahrens wurde auch durch die erfolgreiche Oberflächenpräsentation von vollständigen IgG-Molekülen gezeigt. Dies macht deutlich, dass verschiedene Antikörper-Formate erfolgreich präsentiert werden konnten. Die nicht-kovalente Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen war im Vergleich zu VHH-Fc Fusionsproteinen allerdings komplexer gestaltet, da die Hefezellen im Gegensatz zur Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen, mit drei anstatt mit nur zwei Plasmiden transformiert wurden. Neben dem Plasmid zur Expression der Aga2p-ZZ Fusion wurden zwei weitere Plasmide für die lösliche Sekretion von leichter und schwerer Antikörperkette benötigt. Für die Oberflächenpräsentation des vollständigen Antikörpers musste die Hefezelle folglich während der Kultivierung den stabilen Erhalt aller drei Plasmide ermöglichen. Zu diesem Zweck erfolgte die Selektion des Aga2p-ZZ Plasmids (*pYD-ZZ*) über einen G418-Resistenzmarker und G418-haltiges Medium um die Auxotrophiemarker des EBY100-Stammes zur Selektion der Plasmide für die schwere und leichte Antikörperkette zu verwenden. Das erfolgreiche Einfangen des Antikörpers durch die ZZ-Domäne wurde durch die Markierung und Detektion des Fc-Teils auf der Zelle gezeigt. Die Funktionalität des IgG-Moleküls konnte über die Bindung des spezifischen Antigens nachgewiesen werden. Es konnte allerdings nicht sicher nachgewiesen werden, ob zusätzlich zur schweren Kette auch die



leichte Kette präsentiert wurde, da zu diesem Zeitpunkt kein geeigneter spezifischer Nachweisantikörper für die leichte Kette zur Verfügung stand. Es ist möglich, dass die schweren Antikörperketten auch ohne Assemblierung der leichten Ketten die Bindung an das Antigen vermitteln, da der Hauptteil der Bindung durch die schweren Ketten des IgG-Moleküls erfolgt<sup>177</sup>. Allerdings ist anzunehmen, dass die Assemblierung von leichter und schwerer IgG-Kette erfolgreich war, da sonst vermutlich die Oberflächenpräsentation durch eine verschlechterte Sekretion des Antikörpers vermindert wäre. Da die Zusammenlagerung von leichter und schwerer Kette zusätzlich zur Disulfidbrücke zwischen CH1 und CL über hydrophobe Interaktion erfolgt, wären die hydrophoben Aminosäurereste der schweren Kette im ER exponiert und würden den Mechanismus der UPR induzieren. Interessanterweise konnte die Oberflächenpräsentation eines vollständigen IgG-Moleküls auf Hefezellen nur unter Verwendung des nicht-kovalenten Verfahrens mit der ZZ-Domäne gezeigt werden. Dieser Befund ergab sich durch ein weiteres Experiment, in welchem die schwere IgG-Kette als Aga2p-Fusion kovalent auf der Oberfläche präsentiert wurde, während die leichte Kette löslich sekretiert wurde. In diesem Experiment konnte die schwere Kette über die Markierung des Fc-Teils auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die Detektion der Antigenbindung aber erfolglos. Zur löslichen Sekretion der leichten Kette wurde die von Rakestraw und Mitarbeitern selektierte sekretorische Sequenz app8<sup>111</sup> verwendet, während die schwere Kette als Fusion mit AGA2 exprimiert wurde. Die Wahl des Signalpeptids hat bekanntermaßen einen großen Einfluss auf die Sekretion von heterologen Proteinen aus *S. cerevisiae*, denn das Signalpeptid bestimmt, ob ein Protein sekretiert wird, einen Bestimmungsort in der Zelle hat oder Bestandteil der Zellmembran wird. Hashimoto und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Verwendung verschiedener Signalpeptide einen signifikanten Unterschied in der Sekretionsausbeute zur Folge hat<sup>178</sup>. Das zur Sekretion der leichten Kette verwendete Signalpeptid app8 ist speziell für die effiziente Sekretion von Proteinen durch einen evolutiven Ansatz selektiert worden, der auf dem MF $\alpha$ 1pp Signalpeptid basierte<sup>111</sup>. Bei diesem Signalpeptid handelt es sich um eine 83-Aminosäure pre-pro-Sequenz, die im Gegensatz zu anderen Signalpeptiden sowohl von einer Signalpeptidase zur Translokation ins ER als auch von der Membran-ständigen Protease Kex2p im Golgi-Apparat prozessiert wird. Die schwere Kette hingegen wurde als Fusion mit dem Protein Aga2p sekretiert, welches über zwei Disulfidbrücken mit dem Zellwandprotein Aga1p verbunden ist. Die Prozessierung des reifen Fusionsproteins erfolgt hier vermutlich nur über die ER-lokalisierte Signalpeptidase. Die unterschiedlichen Prozessierungsmechanismen von leichter und schwerer Kette könnten die Zusammenlagerung beider Ketten derart erschweren, dass

---

keine Antigenbindung detektiert werden konnte. Im Falle der oben diskutierten nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation des Antikörpers wurden sowohl die schwere als auch die leichte Kette mit der sekretorischen Sequenz app8 exprimiert. In diesem Fall unterlagen beide Antikörperketten demselben Prozessierungsmechanismus, was vermutlich eine funktionelle Zusammenlagerung sowie die Bindung an das Antigen ermöglichte.

Rakestraw und Mitarbeiter zeigten 2009 die Oberflächenpräsentation eines vollständigen Antikörpers auf Hefezellen mit der SECANT™ Display Technologie<sup>126</sup>. Zur Oberflächenpräsentation wurde dazu die schwere Kette als Fusion mit dem Biotin-Akzeptor Peptid exprimiert. Die Biotinylierung des Biotin-Akzeptor Peptids erfolgte durch die co-exprimierte Biotin-Ligase BirA. Nach chemischer Biotinylierung der Zelloberfläche und Inkubation mit Avidin erfolgt die Präsentation des sekretierten biotinylierten Antikörpers über die Avidin-Biotin Interaktion auf der Zelle. In diesem Ansatz wurden beide Antikörperketten mit der gleichen sekretorischen Sequenz (app8) exprimiert. Sie zeigten die Sekretion eines vollständigen IgG-Moleküls aus *S. cerevisiae* und die nicht-kovalente Oberflächenpräsentation des IgG-Moleküls über die Biotin-Avidin Interaktion. Ein weiteres Beispiel für die Oberflächenpräsentation von vollständigen IgG-Molekülen auf Hefezellen zeigten Sazinsky und Mitarbeiter 2008. Sie präsentierten ein Fluorescein-spezifisches IgG-Molekül über die Bindung an chemisch konjugiertes Fluorescein auf der Zelloberfläche<sup>179</sup>. Diese Art der Oberflächenpräsentation hat allerdings, im Gegensatz zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation über die ZZ-Domäne, den Nachteil, dass IgG-Moleküle über die Bindung zu ihrem Antigen auf der Oberfläche eingefangen werden. Folglich können nur Proteine mit bekannter und ausreichender Affinität präsentiert werden. Des Weiteren muss für jede Selektion eine individuell konjugierte Zelloberfläche generiert werden. Im Gegensatz zu den beiden erwähnten Systemen zur Oberflächenpräsentation, werden IgG-Moleküle in der vorliegenden Arbeit ohne weitere Modifikationen präsentiert, vielmehr werden in dem Verfahren Protein-eigene Strukturen des IgG-Moleküls zur Oberflächenpräsentation genutzt. Dadurch ist garantiert, dass die Antigen-bindenden Fab-Fragmente des Antikörpers frei exponiert sind. Zusätzlich ermöglicht das nicht-kovalente Verfahren die direkte Verwendung des selektierten Klon zur löslichen Sekretion ohne weitere Subklonierungen. Allerdings ist die zur Oberflächenpräsentation verwendete Bindung (ZZ:Fc Interaktion) weniger stabil als die Bindung zwischen Avidin und Biotin.

## 5.7 Genotyp-Phänotyp-Kopplung

Die erfolgreiche Anwendung der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation zur Selektion von Varianten mit veränderten Eigenschaften kann nur gelingen, wenn eine stabile Verknüpfung zwischen der präsentierten Proteinvariante auf der Zelle und der intrazellulären genetischen Information für diese Variante besteht. Ist diese Verknüpfung nicht gegeben, ist die Identifizierung von Varianten während der Selektion nicht möglich. Im Vergleich zur kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen<sup>92</sup> erfordert dieser Aspekt in dem hier vorgestellten System besondere Beachtung, da die Oberflächenpräsentation pH-abhängig und reversibel ist. Es wurde gezeigt, dass die Ansäuerung des Kulturmediums zu einer verschlechterten Bindung zwischen ZZ-Domäne und Fc-Teil führt und dass diese Bindung unter pH 3,3 nicht mehr ausgebildet wird. Ferner besteht die Möglichkeit, dass Proteinvarianten durch Dissoziation und Assoziation der Bindung von ZZ-Domäne und Fc-Teil auf einer „falschen“ Zelle gebunden werden und so die Selektion falsch-positiver Klone auftreten kann. Zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Stabilität der ZZ:Fc-Interaktion. In zwei verschiedenen Mischungsexperimenten wurde diese Interaktion experimentell untersucht.

Im ersten Mischungsexperiment wurden Zellen, die die ZZ-Domäne präsentierten (Zielzellen) über die Bindung von IgG-Molekülen aus einem hohen Überschuss an Kontrollzellen angereichert. Dazu wurden die Zielzellen in einer großen Population an Kontrollzellen verdünnt und innerhalb von drei Selektionsrunden von initial 0,001% bzw. 0,0001% auf 100% bzw. 90% angereichert. Die Markierung der Zielzellen erfolgte durch die sequentielle Bindung von Cetuximab und dem Fluoreszenz-markierten Antigen (b-hsEGFR). Die hohe Rate der Anreicherung von 100% bzw. 90% zeigt die stabile Interaktion zwischen ZZ-Domäne und IgG-Molekül. Des Weiteren wurde die erfolgreiche Anwendung gängiger Selektionsmethoden wie MACS und FACS gezeigt. Einen positiven Einfluss auf die Markierung und Selektion der Zielzellen hatte zweifelsohne die starke Expressionsrate der ZZ-Domäne. Da die Expression der ZZ-Domäne durch den starken Gal1-Promotor reguliert wurde, wurden nach Induktion in Galaktose-haltigem Medium eine große Anzahl ZZ-Domänen auf den Zelloberfläche präsentiert. Ferner wurde eine hohe Konzentration von Cetuximab und hsEGFR zur Markierung der Zellen verwendet, um eine vollständige Absättigung der ZZ-Domänen auf den Zielzellen zu ermöglichen. Dadurch konnten die Zielzellen stark Fluoreszenz-markiert werden und ließen sich im FACS eindeutig von den Kontrollzellen unterscheiden, die eine signifikant geringere rel. Fluoreszenzintensität zeigten. Selbst durch die Dissoziation von IgG-Molekülen von der Zelloberfläche und der Verteilung dieser innerhalb der Zellmischung konnten

Kontrollzellen nicht mit verfügbaren freien IgG-Molekülen markiert werden, da diese keine ZZ-Domänen präsentierten. In diesem Fall war lediglich eine schwache unspezifische Interaktion mit der Zelloberfläche zu erwarten, die nicht zur Selektion falsch-positiver Kontrollzellen führte.

Im zweiten Mischungsexperiment präsentierten sowohl Ziel- als auch Kontrollzellen die ZZ-Domäne. Die Zielzellen sekretierten zusätzlich das hsEGFR-spezifische VHH-Fc Fusionsprotein, während die Kontrollzellen zusätzlich ein nicht-EGFR-spezifisches VHH-Fc Fusionsprotein sekretierten. Beide VHH-Fc Fusionsproteine sollten nur auf der jeweiligen Zellpopulation präsentiert werden. Die Markierung der Zielzellen erfolgte über die Bindung des präsentierten VHH-Fc Fusionsproteins an das Fluoreszenz-markierte Antigen (b-hsEGFR) und SA-PE. Die Bestimmung der Rate der Oberflächenpräsentation beider VHH-Fc Fusionsproteine wurde durch die Markierung des jeweiligen Fc-Teils ermöglicht und erlaubte die Expressionskontrolle der VHH-Fc Fusionsproteine. Dadurch wurde vermieden, dass Expressionsunterschiede zu einer Verfälschung der Selektionsbedingungen führten. Initiale Verdünnungen von 0,001% und 0,0001% wurden hergestellt. Durch drei aufeinanderfolgende Selektionsrunden konnten die Zielzellen innerhalb der Mischungen auf 40% bzw. 80% angereichert werden. In diesem Mischungsexperiment wurden im Gegensatz zum ersten Mischungsexperiment geringere Anreicherungsraten der Zielzellen erreicht. Zusätzlich wurde aus der initial höheren Verdünnung (0,0001%) eine größere Anreicherung der Zielzellen erzielt als aus der initial niedrigeren Verdünnung (0,001%). Dieser Befund ist widersinnig und lässt sich vermutlich mit Fehlern während der Herstellung der Mischungen oder während der Sortierung erklären, da bei der höheren Verdünnung ein deutlich größerer Anspruch an die Sortierung bestand, da weniger Zielzellen initial vorhanden waren. Dieses Mischungsexperiment zeigte, dass der Hauptteil der sekretierten VHH-Fc Proteine auf der eigenen Zelle eingefangen wurde und nicht durch Dissoziation und Diffusion zu einer benachbarten Zelle gelangte und dort gebunden wurde. Da allerdings ein gewisser Anteil des VHH-Fc Fusionsproteins trotzdem durch die kinetischen Eigenschaften der ZZ:Fc-Interaktion von der eigenen ZZ-Domäne dissoziierte, wurde die Diffusion der dissoziierten VHH-Fc Fusionsproteine durch eine statische Kultur und die erhöhte Viskosität durch den Zusatz von 11% (w/v) PEG8000 zum Mediums minimiert. Da die VHH-Fc Fusionsproteine der Ziel- und der Kontrollzellen eine identische Sequenz des Fc-Teils besaßen, wurde vermutet, dass die VHH-Fc Fusionsproteine auf den Kontrollzellen in gleicher Weise von der ZZ-Domäne dissoziierten wie die VHH-Fc Fusionsproteine der Zielzellen. Es besteht die Möglichkeit, dass ein gewisser Teil der hsEGFR-spezifischen VHH-Fc Fusionsproteine (Zielzellen) durch

unbesetzte ZZ-Domänen auf Nachbarzellen eingefangen werden. Diese können sowohl auf Ziel- als auch auf Kontrollzellen lokalisiert sein. Der Anteil an falsch-eingefangenen VHH-Fc Fusionsproteinen dürfte auf Grund der hoch-affinen Bindung zwischen ZZ-Domäne und Fc-Teil allerdings sehr gering sein. Darüber hinaus würden sich falsch-eingefangene VHH-Fc Fusionsproteine innerhalb der gesamten Mischung verteilen und stark verdünnen. Durch die Fluoreszenzmarkierung mit dem Antigen würden diese Signale anschließend im FACS unterhalb des Detektionslimits liegen und in den Bereich der Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle fallen. Dadurch kann eine Selektion von falsch-positiven Zellen ausgeschlossen werden.

Zur Steigerung der Komplexität des Mischungsexperimentes wurden Ziel- und Kontrollzellen zuerst gemischt und anschließend die Oberflächenpräsentation der gesamten Zellmischung induziert. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass während der Kultivierung zur Induktion der Oberflächenpräsentation eine stabile Bindung zwischen ZZ-Domäne und VHH-Fc Fusionsprotein bestand. Dieses Vorgehen repräsentiert im Detail das Vorgehen zur Durchmusterung von Molekülbibliotheken. Folglich scheint das Verfahren der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen als Methode zur Selektion gut geeignet zu sein.

---

## 5.8 Generierung verschiedener VHH-Bibliotheken

---

Zur Erprobung des Verfahrens wurden drei verschiedene VHH-Bibliotheken hergestellt und nicht-kovalent auf Hefezellen präsentiert und charakterisiert. Als Matrize zur Bibliotheksgenerierung wurde die hoch-affine hsEGFR-bindende VHH-Domäne PMP7D12 (*Patent Application* Ablynx N.V. „*Nanobodies and Polypeptides against EGFR and IGF-IF*“, WO 2007/042289 A2) verwendet. Die Bibliothek A wurde mittels *Error-prone* PCR und homologer Rekombination in Hefezellen hergestellt. Für die *Error-prone* PCR wurde eine initiale DNA-Menge der VHH-Sequenz von 10 ng eingesetzt um, eine hohe Mutationsfrequenz des Gens zu erzielen. Diese ist angegeben mit 9 – 16 Mutationen/kb. Auf DNA-Ebene wurde diese Mutationsfrequenz erzielt und führte zu durchschnittlich zwei bis drei Aminosäuresubstitutionen im VHH-Gen. Durch die Aufeinanderfolge von drei *Error-prone* Zyklen akkumulierten jedoch Mutationen, die zum Abbruch der Translation führten und kein vollständiges VHH-Gen darstellten. Insgesamt waren diese Sequenzen mit über 40% in der Bibliothek vertreten.

Die erfolgreiche Substitution von Aminosäuren innerhalb der VHH-Domäne spiegelte sich in der initialen hEGFR-Bindung der Bibliothek wider. Hier zeigte sich wie erwartet eine reduzierte hEGFR-Bindung. Der Hauptteil der Mutationen befand sich in *Framework*-Bereichen der VHH-Domäne. Diese tragen indirekt zur Antigenbindung bei, indem sie zur korrekten Ausrichtung der CDR-Schleifen beitragen<sup>180, 181</sup>. Obwohl nur ca. 5% der Sequenzen Aminosäuresubstitutionen in CDRs aufwiesen, kann dadurch erklärt werden, warum die Antigenbindung trotzdem erheblich beeinflusst war.

Die Generierung der VHH Bibliothek B basierte auf einer anderen Methode zur Diversifizierung der Gensequenz, lieferte aber ähnliche Ergebnisse während der Charakterisierung. Sie zeichnete sich durch die vollständige Randomisierung von CDR1 und CDR2 aus und zeigte bis zu 15 Aminosäuresubstitutionen/VHH-Sequenz. Interessanterweise kam es während der homologen Rekombination, die zur Generierung der Bibliothek genutzt wurde, zu unterschiedlichen Rekombinationsereignissen, wodurch verschieden Mutationsverteilungen zustande kamen. Da zwischen den beiden randomisierten Sequenzbereichen (CDR1 und CDR2) die ursprüngliche Region *Framework 2* vorhanden war, konnte dieser Bereich von der Hefezelle durch das Vorhandensein von homologen Sequenzbereichen zur Reparatur des linearisierten Vektors genutzt werden. Dadurch traten VHH-Varianten auf, bei denen nur eine der beiden CDRs randomisiert vorlag. Allerdings zeigte auch in dieser Bibliothek ein Großteil der Sequenzen die Insertion von Stoppkodonen und das Auftreten von *Frameshifts*. Stoppkodone traten in *Framework 2* und *Framework 3* auf und sind vermutlich auf die Synthese des Oligodesoxyribonukleotids zurückzuführen. Dadurch wurden unvollständige Fusionsproteine generiert. Das spiegelte sich in der Rate der Oberflächenpräsentation wider. Da die VHH-Domäne als C-terminale Fusion mit Fc vorlag (5'-VHH-Fc-3') führte der Translationsstopp der VHH-Domäne nicht zur Synthese des Fc-Teils. Folglich konnten diese Varianten auch nicht auf der Zelle präsentiert werden, da der Fc-Teil zum Einfangen durch die ZZ-Domäne fehlte. Die Anordnung des Fc-Teils wirkte sich während Induktion der Oberflächenpräsentation und der Selektion vorteilhaft aus, da dadurch bereits während der Oberflächenpräsentation eine Vorselektion erfolgte, indem nur vollständige VHH-Fc Fusionsproteine auf der Zelle eingefangen und präsentiert wurden.

Von VHH-Domänen ist bekannt, dass die CDR3 den Großteil der Antigenbindung vermittelt<sup>182</sup>. Das zeigte sich auch durch die Analyse der Bindung der Bibliothek B für das Antigen hEGFR. Die Bibliothek zeigte weiterhin eine Bindung für hEGFR. Allerdings war diese im Vergleich zum Ausgangsklon reduziert. Diese Reduzierung kann durch den Verlust der Bindungsbeteiligung von CDR1 und CDR2 erklärt werden. Außerdem besteht die

Möglichkeit, dass durch die Randomisierung der DNA-Sequenzen von CDR1 und CDR2 neue strukturelle Konformationen der VHH-Domäne auftreten, die sich negativ auf die Ausrichtung der CDR3 auswirken und aus diesem Grund die Bindung an hEGFR beeinträchtigt. Dies könnte z.B. durch die Ausbildung von neuen Disulfidbrücken zwischen CDR1 und CDR2 resultieren.

Besonders elegant erwies sich die Generierung der VHH-Bibliothek C. Hier wurden durch die Imitierung der somatischen Hypermutation, wie sie von B-Zellen während der Reifung bekannt ist, Mutationen in das VHH-Gen eingefügt. Zu diesem Zweck wurde eine *in vivo* Mutagenese der Gensequenz in einem geeigneten Hefestamm durchgeführt, der eine hyperaktive Variante der AID (*Activation-induced deaminase*) exprimierte<sup>183</sup>. Das Konzept der Mutagenese soll hier nicht näher erläutert werden, da sie den Gegenstand einer laufenden Doktorarbeit der Technischen Universität Darmstadt (A. Maaß, AK Prof. Kolmar) bildet. Das Enzym erkennt spezielle humane *Hotspot*-Sequenzen und führt durch Deaminierung zu Nukleotidsubstitutionen<sup>184</sup>. Unter Verwendung dieser Methode wurde eine im Vergleich zu den Bibliotheken A und B geringe Mutationsfrequenz im VHH-Gen beobachtet. Fast 80% der Sequenzen zeigten keine Mutationen, was durch die *camelidae* Sequenz der VHH-Domäne erklärt werden kann. Bei der verwendeten AID handelte es sich um eine humane Variante, die bevorzugt humane *Hotspot*-Sequenzen innerhalb von IgG-Molekülen erkennt. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch eine VHH-Domäne aus dem Kamel verwendet wurde, ist anzunehmen, dass eventuell vorhandene *Hotspots* nicht von der humanen AID erkannt wurden und diese folglich nicht zur Mutagenese des VHH-Gens führte. Zusätzlich war die verwendete VHH-Domäne bereits endogen durch die somatische Hypermutation im Kamel affinitätsmaturiert, da die VHH-Domäne im Vorfeld aus einer immun-Bibliothek selektiert wurde<sup>185</sup>. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass ohnedies schon keine *Hotspots* zur Mutagenese vorhanden waren. Trotz der geringen Mutationsfrequenz und der Tatsache, dass 80% der Bibliothek durch die Ausgangssequenz der hEGFR-spezifischen VHH-Domäne repräsentiert wurden, zeigte die Bibliothek eine deutliche Reduzierung der Bindung an das Antigen hEGFR. Die Vermutung liegt nahe, dass durch die Mutagenese des VHH-Gens auch andere Bereiche des Plasmids von der Mutagenese betroffen waren. Es ist möglich, dass diese Mutationen die Funktionalität der Bibliothek bezüglich der Oberflächenpräsentation beeinträchtigten. Durch Mutationen im Fc-Teil des VHH-Fc Fusionsproteins können strukturellen Veränderungen auftreten, die die Faltung, Disulfidverbrückung und schließlich die Dimerisierung des Fc-Teils stören. Der Fc-Teil wurde nach der Bibliotheksgenerierung diesbezüglich nicht sequenziert. Dadurch könnte die Oberflächenpräsentation der Bibliothek



---

reduziert werden, was im vorliegenden Fall auch beobachtet wurde. Zur Generierung der Bibliothek wurde allerdings die VHH-Gensequenz des zur Mutagenese verwendeten Plasmids mittels PCR amplifiziert und über homologe Rekombination in Hefezellen in einen Vektor transformiert, von dem durch Sequenzierung bekannt war, dass der Fc-Teil mit korrekter Sequenz vorlag. Allerdings konnte nicht sichergestellt werden, dass das als DNA-Matrize verwendete Plasmid während der Reinigung des PCR-Produkts entfernt und vom PCR-Produkt abgetrennt wurde. Durch die hier verwendete Methode ist es nicht möglich, Plasmid DNA von linearen PCR-Produkten dieser Größe zu trennen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass das Matrizenplasmid der PCR als Verunreinigung des PCR-Produkts, zur Transformation während der Bibliotheksgenerierung mittels homologer Rekombination eingesetzt wurde. Vermutlich wurde dieses Plasmid bevorzugt von der Hefezelle erhalten, da es bereits zirkulär vorlag und nicht durch homologe Rekombination „repariert“ werden musste. Da dieses Plasmid jedoch zur *in vivo* Mutagenese in der Hefezelle (Mutatorstamm) verwendet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass auch andere Sequenzbereiche zusätzlich zum VHH-Gen ebenfalls mutiert wurden. Diese Mutationen könnten sich nachteilig auf alle möglichen Eigenschaften des Plasmids und der kodierenden Bereiche auswirken. Es können funktionelle Elemente beeinträchtigt werden, wie z.B. Regulationselemente der Expression (Promotor und Terminator), das Signalpeptid zur löslichen Sekretion des Proteins, Markergene, die den Erhalt des Plasmids in der Zelle beeinflussen oder, wie bereits erwähnt der Fc-Teil des VHH-Fc Fusionsproteins.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die drei generierten VHH-Bibliotheken funktionell auf der Oberfläche von Hefezellen präsentiert werden konnten und dass eine verbleibende Rest-Spezifität der Bibliotheken für das Antigen bestand. Es konnte festgestellt werden, dass alle Bibliotheken eine im Vergleich zum Einzelklon reduzierte Oberflächenpräsentation zeigten, was durch die Markierung des Fc-Teils detektiert wurde. Vermutlich bedarf die Oberflächenpräsentation der Bibliotheken weiterer Optimierung. Das könnte eventuell durch eine verlängerte Expressionsdauer erreicht werden.

---

## 5.9 Schaltbare Oberflächenpräsentation

---

Ein wesentlicher Vorteil des nicht-kovalenten Verfahrens gegenüber dem kovalenten System zur Oberflächenpräsentation auf Hefezellen besteht darin, dass das nicht-kovalente Verfahren die Möglichkeit eröffnet, zwischen den Modi Oberflächenpräsentation und löslicher Sekretion selektiv zu schalten. Erreicht wurde diese schaltbare Funktion, indem unterschiedliche



Promotoren für die Expression der ZZ-Domäne und der VHH-Fc Fusion verwendet wurden. Die Expression der ZZ-Domäne wurde zu diesem Zweck durch den Galaktose-induzierbaren und Glukose-reprimierbaren Gal1-Promotor reguliert, während die Expression der VHH-Fc Fusion konstitutiv durch den GAPDH Promotor erfolgte. Zur Oberflächenpräsentation des VHH-Fc Fusionsproteins wurden Doppeltransformanten in Galaktose-haltigem SG-Medium kultiviert. In diesem Fall wurde die ZZ-Domäne auf der Zelloberfläche als Aga2p-Fusion über die Interaktion mit Aga1p präsentiert und das VHH-Fc Fusionsprotein konnte auf der Zelle eingefangen werden. Das wurde erfolgreich durch die Markierung und Detektion der ZZ-Domäne mit einem spezifischen Nachweisantikörper und durch die Antigenbindung der VHH-Domäne im FACS nachgewiesen. Zur löslichen Sekretion des VHH-Fc Fusionsproteins in den Kulturüberstand wurden die Zellen in Glukose-haltiges SD-Medium überführt. Durch das Glukose-haltige Medium erfolgte die Reprimierung des Gal1-Promotors und dadurch die Reprimierung der Expression der ZZ-Domäne<sup>141</sup>. Dadurch konnte das VHH-Fc Fusionsprotein nicht mehr auf der Zelloberfläche eingefangen werden und wurde in das Kulturmedium sekretiert. Es wurde allerdings beobachtet, dass die verbleibenden ZZ-Domänen, die bereits vor dem Mediumswechsel auf der Zelle präsentiert wurden, auch noch nach dem Transfer in SD-Medium präsentiert wurden (Daten nicht gezeigt). Zu diesem Zweck wurden die Zellen erneut passagiert und eine neue Kultur mit einer sehr niedrigen Zelldichte inokuliert. Durch die Passage wurden die Zellen stark verdünnt, die noch die ZZ-Domäne präsentierten. Die Zellen der nachfolgenden Generationen zeigten aufgrund der reprimierten Expression der ZZ-Domäne keine Oberflächenpräsentation mehr.

Mit der von Rakestraw und Mitarbeitern etablierten SECANT™ *Display* Technologie ist es bereits möglich, selektiv zwischen Oberflächenpräsentation und löslicher Produktion zu schalten. Dieses Verfahren ist im Gegensatz zur Oberflächenpräsentation über die ZZ-Domäne nicht auf das Vorhandensein eines Fc-Teils des zu präsentierenden Proteins beschränkt. Vielmehr wird über die *in vivo*-Biotinylierung des Proteins und der chemischen Konjugation der Zelloberfläche mit Biotin und Avidin die Oberflächenpräsentation ermöglicht. Zur löslichen Produktion wird lediglich auf die chemische Konjugation der Zelle verzichtet. Dieses System erfordert allerdings die Modifikation des Proteins, was bei der Oberflächenpräsentation mit der ZZ-Domäne nicht erforderlich ist. Vor dem Hintergrund der Oberflächenpräsentation von IgG-Molekülen ist demnach mit dem in dieser Arbeit vorgestellten nicht-kovalenten Verfahren die Oberflächenpräsentation des Antikörpers im finalen Format möglich. Dadurch können strukturell bedingte Beeinträchtigungen der Antikörper-Eigenschaften durch artifizielle Modifikationen des Proteins ausgeschlossen werden.

---

## 5.10 Durchmusterung der Bibliothek A

---

Die erste Anwendung des nicht-kovalenten Verfahrens zur Oberflächenpräsentation einer VHH-Varianten-Bibliothek auf Hefezellen und deren Durchmusterung nach Varianten mit neuen Eigenschaften ist in Kapitel 4.21 dargestellt. Die mittels *Error-prone* generierte VHH-Bibliothek A wurde nach Varianten durchmustert, die spezifisch für das Antigen mmEGFR waren. Dieses Antigen wies zu knapp 90% Sequenzhomologien mit dem Antigen hsEGFR auf, für welches die zur Generierung der Bibliothek verwendete parentale VHH-Domäne spezifisch war und für welches die Bibliothek eine noch vorhandene Rest-Spezifität zeigte. Auf Grund der großen Sequenzhomologie zwischen den Antigenen hsEGFR und mmEGFR wurde von einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Selektion ausgegangen. Dieser Ansatz lieferte allerdings nicht die erhofften Ergebnisse und nach der Selektion im FACS über vier Runden und der Charakterisierung von 38 Einzelklonen konnte keine Spezifität dieser Klone für mmEGFR festgestellt werden. In den einzelnen Runden wurden zwar gewisse Anreicherungen während der Sortierung erzielt, diese schienen aber unspezifischer Natur zu sein, da sie sich in den jeweils folgenden Runden nicht mehr reproduzieren ließen und nicht stabil waren. Die zuvor angereicherte Population war nach erneuter Anzucht der Zellen und Induktion der Oberflächenpräsentation in der nächsten Runde nicht mehr detektierbar. Das deutet auf eine unspezifische Markierung der Zellen mit mmEGFR und einen Verlust der angereicherten Zellen von hin. Interessanterweise war eine stetige Zunahme des Fluoreszenzsignals für die Oberflächenpräsentation (rel. Fluoreszenz rot) der VHH-Fc-Fusionsproteine zu beobachten. Dieses Signal stieg von Runde zu Runde an und wurde durch die Fluoreszenzmarkierung des Fc-Teils erzielt. In Runde 4 zeigte sich ein signifikant stärkeres rotes Fluoreszenzsignal als in Runde 1. Zusätzlich überstieg dieses Signal das Oberflächensignal des Einzelklons, der zur Herstellung von Kontrolle A verwendet wurde. In diesem Fall kann von einer erfolgreichen Durchmusterung der Bibliothek in Bezug auf eine verbesserte Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Fusionsproteinen gesprochen werden. Allerdings wurde beobachtet, dass das Level der Oberflächenpräsentation durchaus variabel war und Klone manchmal eine höhere und manchmal eine verringerte Oberflächenpräsentation zeigten. Da während der Selektion durch die Definition des Sortfensters sowohl Zellen sortiert wurden, die ein im Vergleich zur Kontrolle A stärkeres gelbes Fluoreszenzsignal und im Vergleich zur Kontrolle B stärkeres rotes Fluoreszenzsignal hatten, lässt sich dadurch die Anreicherung von Zellen erklären, die eine signifikant bessere Oberflächenpräsentation zeigten als die initiale Bibliothek vor der ersten Sortierung.

Mit der Durchmusterung der Bibliothek nach Varianten, die zusätzlich zur hEGFR-Spezifität eine zweite Spezifität für mmEGFR zeigten, sollten bi-spezifische VHH-Varianten identifiziert werden. Diese Bi-Spezifität sollte durch die Einführung einer neuen Bindestelle innerhalb der hEGFR-spezifischen VHH-Domäne durch die während der *Error-prone* PCR eingeführten Mutationen ermöglicht werden. In diesem Sinne wird in der Literatur die Bezeichnung „dual-spezifische *Two-in-One*“ Antikörper vorgeschlagen, da nicht zwei unabhängige Antigen-bindende Domänen mit verschiedenen Bindungsspezifitäten verbunden werden um die Bi-Spezifität zu ermöglichen, sondern die duale Spezifität innerhalb einer Binde-Domäne verwirklicht ist, die die Bindung von zwei strukturell verschiedenen Antigenen ermöglicht<sup>186</sup>. Bei IgG-Molekülen ist dies naturgemäß das Fab-Fragment, welches aus Anteilen der leichten und schweren Kette gebildet wird. IgG-Moleküle sind durch das Vorhandensein von zwei Fab-Fragmenten bivalent, vermitteln aber pro Fab-Fragment eine monospezifische Bindung. Ausgehend von dem etablierten HER2-spezifischen Antikörper Trastuzumab wurde 2009 von Bostrom und Mitarbeitern der dual-spezifischer Antikörper bH1 entwickelt. Durch die Einführung von Mutationen innerhalb der leichten IgG-Kette wurde eine zweite Spezifität für VEGF (*vascular endothelial growth factor*) eingeführt<sup>186</sup>. Möglich war das durch den Umstand, dass hauptsächlich die CDRs der schweren Kette für die Her2-Bindung beitrugen. Aus diesem Grund erstellten sie eine Varianten-Bibliothek der leichten Kette und durchmusterten diese nach einer zusätzlichen Bindungsspezifität für VEGF.

Der Vorteil von dual-spezifischen *Two-in-One* Antikörpern ist z. B. dass sie im Standard-IgG Format vorliegen und die Bi-Spezifität deshalb im Gegensatz zu anderen bi-spezifischen Konstrukten wie den sogenannten BiTEs (*Bispecific T-cell engager*)<sup>187, 188</sup> ohne artifizielle *Linker* generiert werden kann. Das kann einen positiven Einfluss auf die Produktion und Reinigung des Antikörpers und auf die pharmakokinetischen Eigenschaften des Moleküls haben. Das Ziel der Erzeugung einer dualen Spezifität für die Antigene hEGFR und mmEGFR war in dem vorliegenden Ansatz die Generierung eines Binde-Moleküls (hier VHH-Domäne) mit einer Spezies-übergreifenden Reaktivität, da sich monoklonale Antikörper meist durch eine hohe Affinitäten und nicht Spezies-übergreifende Spezifitäten auszeichnen. Die erfolgreiche Erzeugung einer Reaktivität des Binde-Moleküls gegenüber des murinen Äquivalents des humanen Antigens EGFR ermöglicht eventuell in einer nachfolgenden prä-klinischen Erprobung die erleichterte Evaluierung von pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften und die Generierung toxikologischer Daten im Maus-Modell. Dadurch kann auf die Verwendung von surrogaten Binde-Molekülen verzichtet werden. Bei diesen handelt es sich um analoge Antikörper-Moleküle, die im Tier-Modell das homologe Antigen binden und

einen vergleichbaren *Mode-of-Action* wie die korrespondierenden humanen Antikörper zeigen. Da es sich bei einem Surrogat im Vergleich zum korrespondierenden humanen monoklonalen Antikörper jedoch um ein völlig anderes Antikörper-Moleküle handelt, kann nicht immer von vergleichbaren Bindungseigenschaften des Surrogats ausgegangen werden<sup>189</sup>. Die Spezies-übergreifenden Reaktivität ermöglicht die Verwendung des gleichen Binde-Moleküls im Maus-Modell während der prä-klinischen und der klinischen Erprobung im Menschen.

Als Beispiel für eine natürlich vorkommende multispezifische Domäne kann z.B. der Fc-Teil von Antikörpern betrachtet werden, von welchem bekannt ist, dass er mit Protein A, Protein G, FcRn (neonataler Fc-Rezeptor), Komplementfaktoren und weiteren Fc-Rezeptoren interagiert<sup>190</sup>.

Mit der in der vorliegenden Arbeit generierten *Error-prone* Bibliothek und der anschließenden Selektion unter Verwendung des Verfahrens der nicht-kovalenten Obeflächenpräsentation auf Hefezellen wurde versucht, eine duale Spezifität für zwei unterschiedliche Antigene (hsEGFR und mmEGFR) innerhalb einer einzelnen Domäne zu erzeugen. Die zur Generierung der Bibliothek verwendete VHH-Domäne wies bereits eine hohe Spezifität für das Antigen hsEGFR auf<sup>185</sup>. Durch die eingeführten Mutationen sollte das vorhandene hsEGFR-spezifische Paratop so modifiziert werden, dass die homologen Antigen-Reste von mmEGFR, durch das modifizierte Paratop erkannt werden. Hier besteht ein Unterschied zu dem oben genannten dual-spezifischen Konstrukt, da in dem vorliegenden Fall dieselbe Bindestelle die duale Spezifität vermitteln sollte. Für das Scheitern der Selektion kommen mehrere Ursachen in Betracht. Es ist bekannt, dass die zur Generierung der Bibliothek verwendete VHH-Domäne mit der Bindestelle von Cetuximab an hsEGFR kompetitiert<sup>185</sup>. Dadurch können Rückschlüsse bezüglich der VHH-Bindestelle gezogen werden. Da zusätzlich aus der Literatur bekannt ist, welche Aminosäurereste von hsEGFR für die Bindung an Cetuximab relevant sind, wurden diese Positionen mit den Positionen von mmEGFR verglichen (s. Anhang). Durch den Sequenzvergleich beider Antigene wurde deutlich, dass sie zwar zu einem hohen Grad sequenzhomolog sind, sich jedoch an ~46% der Aminosäurepositionen im Cetuximab-spezifischen Epitop unterscheiden. Insgesamt sind 70 Aminosäuresubstitutionen innerhalb der extrazellulären Domäne von mmEGFR im Vergleich zur extrazellulären Domäne von hsEGFR zu finden. Im Sequenzvergleich sind wichtige Aminosäurereste markiert, die zur Bindung von Cetuximab entscheidend sind. Hierbei handelt es sich um 13 Positionen innerhalb der extrazellulären Domäne (Position 25 – 645)<sup>191</sup>. Sechs dieser Positionen sind im murinen EGFR substituiert. Dieser Befund deutet trotz der 90%-igen Sequenzhomologie beider Antigene auf eine Verringerung der funktionellen Homologie bezüglich der Bindung von Cetuximab hin.

Die Vermutung liegt nahe, dass diese Aminosäurepositionen auch an der Bindung der hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne an hsEGFR beteiligt sind, denn zu Beginn der Arbeit wurde gezeigt, dass die VHH-Domäne für mmEGFR keine Spezifität aufwies. Die Unterschiede in den Aminosäureresten von mmEGFR und hsEGFR bewirken vermutlich eine strukturelle Veränderung des Antigen-Epitops<sup>192</sup>, welches eventuell nicht von der hsEGFR-spezifischen VHH-Domäne gebunden wird. Zusätzlich wurde durch die Sequenzanalyse der Bibliothek gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von CDR3-Mutationen äußerst gering war, da keine der analysierten Sequenzen Mutationen in CDR3 aufwiesen. Es ist bekannt, dass die CDR3 bei cameliden VHH-Domänen den stärksten Anteil der Antigenbindung vermittelt, da sie häufig deutlich länger und strukturell komplexer ist als die CDR1 und CDR2 ist<sup>193</sup>. In der Bibliothek A traten gehäuft eine und zwei Mutationen pro VHH-Domäne auf. Vermutlich war diese Mutationsanzahl zu gering, um eine ausreichende Diversität innerhalb der Bibliothek zu Verfügung zu stellen um eine Spezifität für mmEGFR zu generieren. Des Weiteren zeigte sich eine verschlechterte Oberflächenpräsentation der Bibliothek zu Beginn der Selektion. Dadurch könnten potentielle mmEGFR-bindende Varianten oder schwach bindende Varianten während der Selektion unterrepräsentiert gewesen sein. Um die reduzierte Oberflächenpräsentation zu kompensieren, hätte in diesem Fall eine deutlich größere Zellzahl durchmustert werden müssen. Abschließend kann festgehalten werden, dass die Durchmusterung der Bibliothek A nach dual-spezifischen VHH-Domänen erfolglos war. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und können im Bibliotheksdesign und in der Wahl des Antigens begründet sein. Zusätzlich könnten technische Limitierungen, die mit der Bibliotheksgröße zusammenhängen, entscheidend gewesen sein. Allerdings konnte eine erfolgreiche Anreicherung von Zellen gezeigt werden, die eine verstärkte Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine zeigten. Die verbesserte Oberflächenpräsentation der VHH-Fc Fusionsproteine deutet auf eine mögliche gesteigerte Sekretion der Proteine hin. Dieser Befund müsste allerdings während der löslichen Sekretion innerhalb des Verfahrens der nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen experimentell überprüft werden, in dem selektierte VHH-Fc Varianten aus der Bibliothek A löslich produziert und Proteinkonzentration im Kulturmedium bestimmt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass das Level der Oberflächenpräsentation mit der löslichen Sekretion korreliert<sup>194, 195</sup>.

---

## 6 Ausblick

---

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur nicht-kovalenten Oberflächenpräsentation auf Hefezellen wurde erfolgreich zur Oberflächenpräsentation von VHH-Fc Proteinen und IgG-Molekülen angewendet. Die Stabilität der nicht-kovalenten Interaktion zwischen ZZ-Domäne und Fc-Teil garantierte eine ausreichend stabile Genotyp-Phänotyp-Kopplung und ermöglichte so die Anwendung des Verfahrens bei der Anreicherung von Zielzellen innerhalb verschiedener Mischungen. Zukünftige Anwendungen des Verfahrens liegen z.B. in der Durchmusterung von Bibliotheken von IgG-Molekülen oder diversen Fc-Fusionsproteinen zur Identifizierung von Proteinen mit gewünschten Eigenschaften im Bereich des Protein-*Engineering*. Hier ist die Verwendung einer Bibliothek von Vorteil, von welcher bekannt ist, dass sie Varianten enthält, die den erwünschten Funktionsansprüchen genügen. Da sogar kleinste Unterschiede in den Affinitäten von VHH-Domänen während der Oberflächenpräsentation innerhalb des Verfahrens abgebildet werden konnten, eignet sich dieses Verfahren besonders gut zur Affinitätsmaturierung von Antikörpern mit anschließender löslicher Produktion und biophysikalischer Charakterisierung.

Zur Vereinfachung des Verfahrens kann die Verwendung alternativer Ankerproteine für die Oberflächenpräsentation der ZZ-Domäne erprobt werden, da dadurch die Anwendung nicht mehr auf die Verwendung des Hefestamms EBY100 limitiert ist. Prinzipiell sind viele Zellwandproteine aus *S. cerevisiae* zur Oberflächenpräsentation von heterologen Proteinen tauglich. In der Literatur sind hierzu zahlreiche Beispiele beschrieben<sup>93, 99</sup>. Die Verwendung eines alternativen Ankerproteins ermöglicht die unabhängige Wahl des Expressionsstamms, da nicht mehr zwangsweise ein Stamm mit chromosomaler Integration der Aga1-Expressionskassette, wie EBY100, verwendet werden muss. Das eröffnet zusätzlich die Möglichkeit, einen für spezifische Ansprüche des heterologen Proteins geeigneten Expressionsstamm zu generieren und zu verwenden.

Des Weiteren könnte es sich als vorteilhaft erweisen, die ZZ-Domäne stabil in das Hefegenom zu integrieren, um eine flexiblere Markerwahl für die lösliche Sekretion und eine erleichterte Generierung von Molekül-Bibliotheken zu ermöglichen. Zur Erhöhung der Sekretionseffizienz ist eine weitere Stamm-Manipulation zu empfehlen, da die alleinige Überexpression der Oxidoreduktase PDI nicht zu den gewünschten Proteinausbeuten geführt hat. Eventuell ist die Überexpression weiterer, an der Sekretion beteiligter ER-lokalisierter Proteine, wie z.B. Ero1p erforderlich, um die gewünschten Proteinausbeuten zu erzielen. Die Identifizierung geeigneter Proteine bedarf der weiteren experimentellen Überprüfung.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Swinney, D. C. & Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 507-519 (2011).
2. Venter, J. C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
3. Futreal, P. A. *et al.* BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* **266**, 120-122 (1994).
4. Miki, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71 (1994).
5. Munos, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 959-968 (2009).
6. DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J. Health Econ.* **22**, 151-185 (2003).
7. Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H. & Warrington, B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 191-200 (2012).
8. Research and Development in the pharmaceutical industry, Study for the Congressional Budget Office, Congress of the United States of America. 2006. Referenztyp: Onlinequelle
9. Beckman, R. A., Weiner, L. M., & Davis, H. M. Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* **109**, 170-179 (2007).
10. Porro, D., Sauer, M., Branduardi, P., & Mattanovich, D. Recombinant protein production in yeasts. *Mol. Biotechnol.* **31**, 245-259 (2005).
11. Sudbery, P. E. The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 517-524 (1996).
12. Benson, J. D. *et al.* Validating cancer drug targets. *Nature* **441**, 451-456 (2006).
13. Klapper, L. N., Kirschbaum, M. H., Sela, M., & Yarden, Y. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv. Cancer Res.* **77**, 25-79 (2000).
14. Huang, S. M. & Harari, P. M. Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs* **17**, 259-269 (1999).



15. Huang, S. M., Bock, J. M., & Harari, P. M. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* **59**, 1935-1940 (1999).
16. Sato, J. D. *et al.* Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol. Biol. Med.* **1**, 511-529 (1983).
17. Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., & Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **19**, 183-232 (1995).
18. Baselga, J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer* **37 Suppl 4**, S16-S22 (2001).
19. PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. 2012. Referenztyp: Onlinequelle
20. Imai, K. & Takaoka, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 714-727 (2006).
21. Thurber, G. M., Schmidt, M. M., & Wittrup, K. D. Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 57-61 (2008).
22. Roopenian, D. C. & Akilesh, S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 715-725 (2007).
23. Carter, P. J. Potent antibody therapeutics by design. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 343-357 (2006).
24. Goldberg, R. M. Cetuximab. *Nat. Rev. Drug Discov.* **Suppl**, S10-S11 (2005).
25. Baselga, J. Targeting tyrosine kinases in cancer: the second wave. *Science* **312**, 1175-1178 (2006).
26. Huang, S., Armstrong, E. A., Benavente, S., Chinnaiyan, P. & Harari, P. M. Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res.* **64**, 5355-5362 (2004).
27. Iannello, A. & Ahmad, A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 487-499 (2005).
28. Nakamura, A., Kubo, T. & Takai, T. Fc receptor targeting in the treatment of allergy, autoimmune diseases and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **640**, 220-233 (2008).
29. Yalow, R. S. & Berson, S. A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* **184 (Suppl 21)**, 1648-1649 (1959).
30. van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **15**, 232-236 (1971).



31. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. **8**, 871-874 (1971).
32. Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. *Janeway's Immunobiology* (Garlan Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008).
33. Filpula, D. Antibody engineering and modification technologies. *Biomol. Eng* **24**, 201-215 (2007).
34. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 34-47 (2008).
35. Idusogie, E. E. *et al.* Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J. Immunol.* **164**, 4178-4184 (2000).
36. Natsume, A., Niwa, R. & Satoh, M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: Enhancing ADCC and CDC. *Drug Des Devel. Ther.* **3**, 7-16 (2009).
37. Brambell, F. W. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet* **2**, 1087-1093 (1966).
38. Kohler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
39. Yuan, F. F., Watt, J. M. & Geczy, A. F. Does hybridoma technology still have a place in transfusion medicine? *Transfus. Med. Rev.* **16**, 230-238 (2002).
40. Worn, A. & Pluckthun, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **305**, 989-1010 (2001).
41. Chames, P., Van, R. M., Weiss, E. & Baty, D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 220-233 (2009).
42. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1126-1136 (2005).
43. Bird, R. E. *et al.* Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423-426 (1988).
44. Kontermann, R. E. Alternative antibody formats. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **12**, 176-183 (2010).
45. Wesolowski, J. *et al.* Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.* **198**, 157-174 (2009).
46. Holliger, P., Prospero, T. & Winter, G. "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 6444-6448 (1993).
47. Todorovska, A. *et al.* Design and application of diabodies, triabodies and tetrabodies for cancer targeting. *J. Immunol. Methods* **248**, 47-66 (2001).

48. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448 (1993).
49. Muyldermans, S. Single domain camel antibodies: current status. *J. Biotechnol.* **74**, 277-302 (2001).
50. De, G. E., Saerens, D., Muyldermans, S. & Conrath, K. Antibody repertoire development in camelids. *Dev. Comp Immunol.* **30**, 187-198 (2006).
51. Simmons, D. P. *et al.* Dimerisation strategies for shark IgNAR single domain antibody fragments. *J. Immunol. Methods* **315**, 171-184 (2006).
52. Wu, T. T., Johnson, G. & Kabat, E. A. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* **16**, 1-7 (1993).
53. Harmsen, M. M. & De Haard, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 13-22 (2007).
54. Muyldermans, S., Atarhouch, T., Saldanha, J., Barbosa, J.A. & Hamers, R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* **7**, 1129-1135 (1994).
55. Desmyter, A., Decanniere, K., Muyldermans, S. & Wyns, L. Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J. Biol. Chem.* **276**, 26285-26290 (2001).
56. Chothia, C., Novotny, J., Brucoleri, R. & Karplus, M. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J. Mol. Biol.* **186**, 651-663 (1985).
57. Desmyter, A. *et al.* Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 803-811 (1996).
58. Braden, B. C. *et al.* Three-dimensional structures of the free and the antigen-complexed Fab from monoclonal anti-lysozyme antibody D44.1. *J. Mol. Biol.* **243**, 767-781 (1994).
59. van der Linden, R. H. *et al.* Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 37-46 (1999).
60. Cortez-Retamozo, V. *et al.* Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer* **98**, 456-462 (2002).
61. Boström, T., Nilvebrant, J. & Hober, S. Purification Systems Based on Bacterial Surface Proteins, Protein Purification, Rizwan Ahmad (Ed.), ISBN: 978-953-307-831-1, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/protein-purification/purification-systems-based-on-bacterial-surface-proteins>. 2012. Referenztyp: Onlinequelle

62. Foster, T. J. Immune evasion by staphylococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 948-958 (2005).
63. Moks, T. *et al.* Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. *Eur. J. Biochem.* **156**, 637-643 (1986).
64. Jansson, B., Uhlen, M. & Nygren, P. A. All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20**, 69-78 (1998).
65. Uhlen, M. *et al.* Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. *J. Biol. Chem.* **259**, 1695-1702 (1984).
66. Akerstrom, B. & Bjorck, L. A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. *J. Biol. Chem.* **261**, 10240-10247 (1986).
67. Nilsson, B. *et al.* A synthetic IgG-binding domain based on staphylococcal protein A. *Protein Eng* **1**, 107-113 (1987).
68. Ljungberg, U. K. *et al.* The interaction between different domains of staphylococcal protein a and human polyclonal IgG, IgA, IgM and F(ab')<sub>2</sub>: Separation of affinity from specificity. *Molecular Immunology* **30**, 1279-1285 (1993).
69. Tashiro, M. *et al.* High-resolution solution NMR structure of the Z domain of staphylococcal protein A. *J. Mol. Biol.* **272**, 573-590 (1997).
70. Jendeborg, L. *et al.* The mechanism of binding staphylococcal protein A to immunoglobulin G does not involve helix unwinding. *Biochemistry* **35**, 22-31 (1996).
71. Nilsson, J. *et al.* Competitive Elution of Protein A Fusion Proteins Allows Specific Recovery Under Mild Conditions. *European Journal of Biochemistry* **224**, 103-108 (1994).
72. Kuypers, D. R. & Vanrenterghem, Y.F. Monoclonal antibodies in renal transplantation: old and new. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 297-300 (2004).
73. Renders, L. & Valerius, T. Engineered CD3 antibodies for immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 307-309 (2003).
74. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 325-338 (2010).
75. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323-327 (1988).
76. Lonberg, N. Human antibodies from transgenic animals. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1117-1125 (2005).
77. Lonberg, N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 450-459 (2008).

78. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323-327 (1988).
79. Hoogenboom, H. R. Selecting and screening recombinant antibody libraries. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1105-1116 (2005).
80. Jung, Y. S. *et al.* Generation of human monoclonal antibodies against *Propionibacterium acnes* by applying the phage display method to human peripheral blood mononuclear cells immunized in vitro. *Cytotechnology* **57**, 169-175 (2008).
81. Kuroda, D., Shirai, H., Kobori, M. & Nakamura, H. Systematic classification of CDR-L3 in antibodies: implications of the light chain subtypes and the VL-VH interface. *Proteins* **75**, 139-146 (2009).
82. Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* **273**, 927-948 (1997).
83. Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. & Winter, G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**, 323-327 (1988).
84. Arnold, F. H. & Moore, J. C. Optimizing industrial enzymes by directed evolution. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **58**, 1-14 (1997).
85. Dougherty, M. J. & Arnold, F. H. Directed evolution: new parts and optimized function. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 486-491 (2009).
86. Kaur, J. & Sharma, R. Directed evolution: an approach to engineer enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **26**, 165-199 (2006).
87. Stemmer, W. P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**, 389-391 (1994).
88. Blagodatski, A. & Katanaev, V. L. Technologies of directed protein evolution in vivo. *Cell Mol. Life Sci.* **68**, 1207-1214 (2011).
89. Hanes, J. & Pluckthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 4937-4942 (1997).
90. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
91. Jespers, L. S., Roberts, A., Mahler, S. M., Winter, G. & Hoogenboom, H. R. Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. *Biotechnology (N. Y.)* **12**, 899-903 (1994).
92. Boder, E. T. & Wittrup, K. D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**, 553-557 (1997).
93. van der Vaart, J. M. *et al.* Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 615-620 (1997).

94. Sato, N. *et al.* Long anchor using Flo1 protein enhances reactivity of cell surface-displayed glucoamylase to polymer substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 469-474 (2002).
95. Feldhaus, M. J. *et al.* Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Nat. Biotechnol.* **21**, 163-170 (2003).
96. van den Beucken, T. *et al.* Affinity maturation of Fab antibody fragments by fluorescent-activated cell sorting of yeast-displayed libraries. *FEBS Lett.* **546**, 288-294 (2003).
97. Kondo, A. & Ueda, M. Yeast cell-surface display--applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 28-40 (2004).
98. Huang, G., Zhang, M. & Erdman, S. E. Posttranslational modifications required for cell surface localization and function of the fungal adhesin Aga1p. *Eukaryot. Cell* **2**, 1099-1114 (2003).
99. Pepper, L. R., Cho, Y. K., Boder, E. T. & Shusta, E. V. A decade of yeast surface display technology: where are we now? *Comb. Chem. High Throughput. Screen.* **11**, 127-134 (2008).
100. Skerra, A. & Pluckthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038-1041 (1988).
101. Jost, C. R. *et al.* Mammalian expression and secretion of functional single-chain Fv molecules. *J. Biol. Chem.* **269**, 26267-26273 (1994).
102. Goffeau, A. *et al.* Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546, 563-546, 567 (1996).
103. Mortimer, R. K., Contopoulou, C. R. & King, J. S. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*, Edition 11. *Yeast* **8**, 817-902 (1992).
104. Jeong, K. J., Jang, S. H. & Velmurugan, N. Recombinant antibodies: engineering and production in yeast and bacterial hosts. *Biotechnol. J.* **6**, 16-27 (2011).
105. Strausberg, R. L. & Strausberg, S. L. Overview of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 5**, Unit5 (2001).
106. Muller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P. & Dalboge, H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-1283 (1998).
107. Freyre, F. M. *et al.* Very high expression of an anti-carcinoembryonic antigen single chain Fv antibody fragment in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* **76**, 157-163 (2000).
108. Kretzschmar, T. *et al.* High-level expression in insect cells and purification of secreted monomeric single-chain Fv antibodies. *J. Immunol. Methods* **195**, 93-101 (1996).

109. Sanchez, L. *et al.* High cytoplasmic expression in *E. coli*, purification, and in vitro refolding of a single chain Fv antibody fragment against the hepatitis B surface antigen. *J. Biotechnol.* **72**, 13-20 (1999).
110. Horwitz, A. H., Chang, C. P., Better, M., Hellstrom, K. E. & Robinson, R. R. Secretion of functional antibody and Fab fragment from yeast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 8678-8682 (1988).
111. Rakestraw, J. A., Sazinsky, S. L., Piatetsi, A., Antipov, E. & Wittrup, K. D. Directed evolution of a secretory leader for the improved expression of heterologous proteins and full-length antibodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 1192-1201 (2009).
112. Machamer, C. E., Doms, R. W., Bole, D. G., Helenius, A. & Rose, J. K. Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 6879-6883 (1990).
113. Nguyen, T. H., Law, D. T. & Williams, D. B. Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 1565-1569 (1991).
114. Xu, P. & Robinson, A. S. Decreased secretion and unfolded protein response up-regulation are correlated with intracellular retention for single-chain antibody variants produced in yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **104**, 20-29 (2009).
115. Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H. & Takegawa, K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 403-417 (2010).
116. Knippers, R. *Molekulare Genetik. 9. komplett überarbeitete Auflage*(Thieme Verlag,2006).
117. Mattanovich, D., Gasser, B., Hohenblum, H. & Sauer, M. Stress in recombinant protein producing yeasts. *J. Biotechnol.* **113**, 121-135 (2004).
118. Shusta, E. V., Raines, R. T., Pluckthun, A. & Wittrup, K. D. Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **16**, 773-777 (1998).
119. Cereghino, G. P. & Cregg, J. M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 422-427 (1999).
120. Suga, M. & Hatakeyama, T. High-efficiency electroporation by freezing intact yeast cells with addition of calcium. *Curr. Genet.* **43**, 206-211 (2003).
121. Benatuil, L., Perez, J. M., Belk, J. & Hsieh, C. M. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Eng Des Sel* **23**, 155-159 (2010).
122. Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. & Rothstein, R. J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **78**, 6354-6358 (1981).



123. Orr-Weaver, T. L. & Szostak, J. W. Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **80**, 4417-4421 (1983).
124. Ma, H., Kunes, S., Schatz, P. J. & Botstein, D. Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene* **58**, 201-216 (1987).
125. Chao, G. *et al.* Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat. Protoc.* **1**, 755-768 (2006).
126. Rakestraw, J. A., Aird, D., Aha, P. M., Baynes, B. M. & Lipovsek, D. Secretion-and-capture cell-surface display for selection of target-binding proteins. *Protein Eng Des Sel* **24**, 525-530 (2011).
127. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
128. Meyer, T. S. & Lamberts, B. L. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**, 144-145 (1965).
129. Gultekin, H. & Heermann, K. H. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* **172**, 320-329 (1988).
130. Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**, 3116-3120 (1979).
131. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263-273 (1986).
132. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491 (1988).
133. Saiki, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354 (1985).
134. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
135. Murray, V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**, 8889 (1989).
136. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554 (1990).
137. Wittrup, K. D. Disulfide bond formation and eukaryotic secretory productivity. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 203-208 (1995).

138. Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. & Fink, G. R. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* **154**, 164-175 (1987).
139. Veit, B. E. & Fangman, W. L. Copy number and partition of the *Saccharomyces cerevisiae* 2 micron plasmid controlled by transcription regulators. *Mol. Cell Biol.* **8**, 4949-4957 (1988).
140. Uma Maheswar Rao, J. L. & Satyanarayana, T. Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent  $\alpha$ -amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Letters in Applied Microbiology* **36**, 191-196 (2003).
141. Romanos, M. A., Scorer, C. A. & Clare, J. J. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488 (1992).
142. Kuroda, K. *et al.* Efficient antibody production upon suppression of O mannosylation in the yeast *Ogataea minuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 446-453 (2008).
143. Kronvall, G. & Williams, R. C., Jr. Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J. Immunol.* **103**, 828-833 (1969).
144. Jendeborg, L. *et al.* Kinetic analysis of the interaction between protein A domain variants and human Fc using plasmon resonance detection. *J. Mol. Recognit.* **8**, 270-278 (1995).
145. Boyle, M. D., Wallner, W. A., von Mering, G. O., Reis, K. J. & Lawman, M. J. Interaction of bacterial Fc receptors with goat immunoglobulins. *Mol. Immunol.* **22**, 1115-1121 (1985).
146. Heitzmann, H. & Richards, F. M. Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **71**, 3537-3541 (1974).
147. Fukuda, N. *et al.* High-efficiency recovery of target cells using improved yeast display system for detection of protein-protein interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 151-158 (2007).
148. Wang, M., Yang, Z., Rada, C., & Neuberger, M. S. AID upmutants isolated using a high-throughput screen highlight the immunity/cancer balance limiting DNA deaminase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 769-776 (2009).
149. Cedergren, L., Andersson, R., Jansson, B., Uhlen, M. & Nilsson, B. Mutational analysis of the interaction between staphylococcal protein A and human IgG1. *Protein Eng* **6**, 441-448 (1993).
150. Eliasson, M., Andersson, R., Olsson, A., Wigzell, H. & Uhlen, M. Differential IgG-binding characteristics of staphylococcal protein A, streptococcal protein G, and a chimeric protein AG. *J. Immunol.* **142**, 575-581 (1989).



151. Langone, J. J., Boyle, M. D. & Borsos, T. Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. I. Effect of protein A on the functional activity of IgG. *J. Immunol.* **121**, 327-332 (1978).
152. Langone, J. J., Boyle, M. D. & Borsos, T. Studies on the interaction between protein A and immunoglobulin G. II. Composition and activity of complexes formed between protein A and IgG. *J. Immunol.* **121**, 333-338 (1978).
153. Sjoquist, J., Meloun, B. & Hjelm, H. Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. *Eur. J. Biochem.* **29**, 572-578 (1972).
154. Mazor, Y., Van, B. T., Mabry, R., Iverson, B. L. & Georgiou, G. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **25**, 563-565 (2007).
155. Mazor, Y., Van, B. T., Iverson, B. L. & Georgiou, G. E-clonal antibodies: selection of full-length IgG antibodies using bacterial periplasmic display. *Nat. Protoc.* **3**, 1766-1777 (2008).
156. Ojala, K. *et al.* Improved display of synthetic IgG-binding domains on the baculovirus surface. *Technol. Cancer Res. Treat.* **3**, 77-84 (2004).
157. Mazor, Y., Van, B. T., Carroll, S. & Georgiou, G. Selection of full-length IgGs by tandem display on filamentous phage particles and *Escherichia coli* fluorescence-activated cell sorting screening. *FEBS J.* **277**, 2291-2303 (2010).
158. Nakamura, Y. *et al.* Development of novel whole-cell immunoadsorbents by yeast surface display of the IgG-binding domain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 500-505 (2001).
159. Ito, J. *et al.* Regulation of the display ratio of enzymes on the *Saccharomyces cerevisiae* cell surface by the immunoglobulin G and cellosomal enzyme binding domains. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4149-4154 (2009).
160. Samuelsson, E., Moks, T., Nilsson, B. & Uhlen, M. Enhanced in vitro refolding of insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner. *Biochemistry* **33**, 4207-4211 (1994).
161. Samuelsson, E. & Uhlen, M. Chaperone-like effect during in vitro refolding of insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **782**, 486-494 (1996).
162. Robinson, A. S., Hines, V., & Wittrup, K. D. Protein disulfide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N. Y.)* **12**, 381-384 (1994).
163. Hiniker, A. & Bardwell, J. C. Disulfide relays between and within proteins: the Ero1p structure. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 516-519 (2004).
164. Gühlich, S., Uhlén, M. & Hober, S. Protein engineering of an IgG-binding domain allows milder elution conditions during affinity chromatography. *Journal of Biotechnology* **76**, 233-243 (2000).

165. Schekman, R. The secretory pathway in yeast. *Trends in Biochemical Sciences* **7**, 243-246 (1982).
166. Arnold, K., Herrmann, A., Pratsch, L. & Gawrisch, K. The dielectric properties of aqueous solutions of poly(ethylene glycol) and their influence on membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **815**, 515-518 (1985).
167. Kuhl, T. *et al.* Direct Measurement of Polyethylene Glycol Induced Depletion Attraction between Lipid Bilayers. *Langmuir* **12**, 3003-3014 (1996).
168. Boni, L. T., Stewart, T. P., Alderfer, J. L. & Hui, S. W. Lipid-polyethylene glycol interactions: I. Induction of fusion between liposomes. *J. Membr. Biol.* **62**, 65-70 (1981).
169. Kramer, W., Elmecker, G., Weik, R., Mattanovich, D. & Bayer, K. Kinetic Studies for the Optimization of Recombinant Protein Formation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **782**, 323-333 (1996).
170. Sanden, A. M. *et al.* Limiting factors in Escherichia coli fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 158-166 (2003).
171. Barthelemy, P. A. *et al.* Comprehensive analysis of the factors contributing to the stability and solubility of autonomous human VH domains. *J. Biol. Chem.* **283**, 3639-3654 (2008).
172. Ueda, M. & Tanaka, A. Genetic immobilization of proteins on the yeast cell surface. *Biotechnol. Adv.* **18**, 121-140 (2000).
173. Schmiedl, A. & Dübel, S. Rekombinante Antikörper und Phagen Display. Wiley-VCH aus "Molekulare Biotechnologie" . 2004. M. Wink, Wiley-VCH. Referenztyp: Magazinartikel
174. Saerens, D., Ghassabeh, G. H., & Muyldermans, S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **8**, 600-608 (2008).
175. Yamane-Ohnuki, N. & Satoh, M. Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation. *MAbs.* **1**, 230-236 (2009).
176. Deisenhofer, J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from Staphylococcus aureus at 2.9- and 2.8-Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361-2370 (1981).
177. Vajdos, F. F. *et al.* Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun scanning mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **320**, 415-428 (2002).
178. Hashimoto, Y., Koyabu, N. & Imoto, T. Effects of signal sequences on the secretion of hen lysozyme by yeast: construction of four secretion cassette vectors. *Protein Eng* **11**, 75-77 (1998).

179. Sazinsky, S. L. *et al.* Aglycosylated immunoglobulin G1 variants productively engage activating Fc receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 20167-20172 (2008).
180. Ewert, S., Cambillau, C., Conrath, K. & Pluckthun, A. Biophysical properties of camelid V(HH) domains compared to those of human V(H)3 domains. *Biochemistry* **41**, 3628-3636 (2002).
181. Ewert, S., Huber, T., Honegger, A. & Pluckthun, A. Biophysical properties of human antibody variable domains. *J. Mol. Biol.* **325**, 531-553 (2003).
182. De, G.E. *et al.* Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 4586-4591 (2006).
183. Wang, M., Yang, Z., Rada, C. & Neuberger, M. S. AID upmutants isolated using a high-throughput screen highlight the immunity/cancer balance limiting DNA deaminase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 769-776 (2009).
184. Neuberger, M. S. *et al.* Somatic hypermutation at A.T pairs: polymerase error versus dUTP incorporation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 171-178 (2005).
185. Ablynx N.V. Nanobodies and Polypeptides against EGFR and IGF-IF. WO 2007/042289 A2. 2007.  
Referenztyp: Patent
186. Bostrom, J. *et al.* Variants of the antibody herceptin that interact with HER2 and VEGF at the antigen binding site. *Science* **323**, 1610-1614 (2009).
187. Baeuerle, P. A. & Reinhardt, C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* **69**, 4941-4944 (2009).
188. Mack, M., Riethmuller, G. & Kufer, P. A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7021-7025 (1995).
189. Brennan, F. R. *et al.* Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs.* **2**, 233-255 (2010).
190. DeLano, W. L., Ultsch, M.H., de Vos, A.M., & Wells, J.A. Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* **287**, 1279-1283 (2000).
191. Li, S. *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301-311 (2005).
192. Loisel, S. *et al.* Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **62**, 34-42 (2007).
193. Muyldermans, S., Cambillau, C. & Wyns, L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 230-235 (2001).

- 
194. Shusta, E. V., Kieke, M.C., Parke, E., Kranz, D.M., & Wittrup, K.D. Yeast polypeptide fusion surface display levels predict thermal stability and soluble secretion efficiency. *J. Mol. Biol.* **292**, 949-956 (1999).
  195. Kieke, M. C. *et al.* Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 5651-5656 (1999).

## 8 Anhang

### 8.1 Proteinsequenzen von hsEGFR und mmEGFR

	10	20	30	40	50	60	70
hsEGFR	LEEKKVCQ	GT	SNKLTQL	GT	FEDHFL	SLQRMF	NNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLI
mmEGFR		R		Y			
	80	90	100	110	120	130	140
hsEGFR	TVERIPLEN	LQIIRGN	MYE	NSYALAVLS	SNYDANKTGL	KELPMRNLQEI	LHGAVRFSNNPALCNVESIQW
mmEGFR		AL	T	I	GT	R	R
	150	160	170	180	190	200	210
hsEGFR	RDIVSSDF	LSNMSMD	FQNH	LGSCQK	CDPSC	PNCS	WCWAGEENCQKLTKIICAQQCSGR
mmEGFR		QNV	M	L	S	PS	P
	220	230	240	250	260	270	280
hsEGFR	QCAAGCTG	PRESDCL	VCRKFR	DEATCKD	TCPP	LMLYNPTTYQ	MNVNPEGKYSFGATCVKKCPRN
mmEGFR		Q	Q				
	290	300	310	320	330	340	350
hsEGFR	GSCVRACG	ADSYEME	EDGVRK	CKKCEGP	CRKVC	NGIGIGEF	KDLSINATNIKHFKNCT
mmEGFR		P	Y	V	I	D	T
	360	370	380	390	400	410	420
hsEGFR	AFRGDSF	THTPPLD	PQELDIL	KTVKEIT	GFLLIQ	AWPENRTDL	HAFENLEIIRGRTKHGQFSLAVVSLN
mmEGFR		K	R	R	E	D	W
	430	440	450	460	470	480	490
hsEGFR	ITSLGLR	SLKEISD	GDDVIIS	GNKLCY	ANTINW	KKLFGTSG	QKTIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEG
mmEGFR			R		PN	MN	A
	500	510	520	530	540	550	560
hsEGFR	CWGPEPR	DCVSCR	NVSRG	RECVDK	CNLL	EGEPRE	FVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAH
mmEGFR		Q	E	I			
	570	580	590	600	610	620	
hsEGFR	YIDGPH	CVKTC	PAGVM	GENNTL	VWKYAD	AGHVCH	LCHPNCTYGCTGPGLEGCP
mmEGFR		I	NN	A	A	Q	EVWPSGPKIPS

Abb. 8.1: Proteinsequenzen der ECD von hsEGFR und mmEGFR.

Dargestellt sind die Proteinsequenzen der extrazellulären Domäne (ECD) von hsEGFR und mmEGFR im Vergleich. Die Informationen wurden der UniProt *Knowledge Database* entnommen (hsEGFR #P00533, mmEGFR #Q01279). Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen der IUPAC-Nomenklatur.

Tab. 8.1: Aminosäurepositionen des Cetuximab Epitops (hsEGFR).

Position	hsEGFR	mmEGFR
353	R	K
408	Q	Q
409	H	H
417	V	V
418	S	G
443	K	R
463	K	K
467	I	S
468	M	N
473	N	K

In Tab. 8.1 sind die Aminosäurepositionen des Cetuximab Epitops von hsEGFR und die entsprechenden Aminosäuren von mmEGFR gezeigt. Von hsEGFR abweichende Aminosäurereste sind grau hinterlegt. Diese Information wurde aus der Studie von Li und Mitarbeitern<sup>191</sup> aus dem Jahr 2005 entnommen.

## 8.2 Oligodesoxyribonukleotid zur Herstellung der Bibliothek B

In der nachfolgend gezeigten DNA-Sequenz ist die zur Herstellung von Bibliothek B verwendete Oligodesoxyribonukleotid-Sequenz gezeigt, die von Eurofins MWG Operon bezogen wurde. Grün hinterlegt ist die NNK-randomisierte Sequenz der CDR1, grau hinterlegt ist die NNK-randomisierte Sequenz der CDR2, gelb hinterlegt sind die für *Framework*-Bereiche kodierenden Sequenzen.

5` GGAAGCCTCAGGCTCACGTGCGCTGCGTCTNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKATG  
GGATGGTTTAGGCAGGCGCCAGGCAAGGAACGAGAATTCGTCTCCGGAANNKNNKNNKNNKNN  
KNNKNNKACCGGTTACGCCGATTCCGTTAAAGGACGC 3`

Anmerkung: N: A oder C/ G oder T

K: G oder T

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2009 bis Oktober 2012 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt sowie bei der Firma Merck KGaA in Darmstadt angefertigt.

### 8.3 Lebenslauf

**Name:** Laura Rhiel, geb. Albrecht  
**Geburtsdatum:** 19. Juni 1982  
**Nationalität:** deutsch  
**Familienstand:** verheiratet

#### Studium der Biologie:

**Dissertation:** 2009 bis 2012. Seit April 2009 Doktorandin bei der Firma Merck KGaA in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kolmar, Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Technische Universität Darmstadt

**Hauptstudium:** 2006 bis 2009 Goethe-Universität Frankfurt/Main  
 Diplomarbeit bei der Firma Merck KGaA in Darmstadt.  
 Titel: „*Grafting* der Komplementaritäts-determinierenden Regionen von c-Met spezifischen Fab-Antikörper-Fragmenten auf die Gerüstregion von *Artificial Interacting Molecules* und deren Charakterisierung“. Diplom im April 2009. Gesamtnote: „Sehr gut“.

**Grundstudium:** 2004 bis 2006 Justus-Liebig-Universität Gießen  
 Diplom-Vorprüfung im August 2006

**Praktika:** Juli bis Sept. 2007 Teilnahme am Projekt „Wiederansiedlung einheimischer Beuteltiere in Australien“ der Goethe-Universität Frankfurt/Main und der University of Western Australia, Perth, WA

#### Ausbildung und Beruf:

**Berufspraxis:** 2003 bis 2004 Anstellung als chemisch-technische Assistentin bei der Firma Temmler Pharma GmbH & Co. KG, Marburg/Lahn

**Berufsausbildung:** 2000 bis 2002 Ausbildung zur staatlich geprüften chemisch-technischen Assistentin an der Adolf-Reichwein-Schule Marburg/Lahn. Abschlussprüfung im Juni 2002

**Schulausbildung:** 1998 bis 2001 Berufliches Gymnasium Adolf-Reichwein-Schule, Marburg/Lahn. Abitur im Juni 2001

Laura Rhiel



---

## 8.4 Danksagung

---

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Harald Kolmar für die hervorragende Betreuung meiner Promotion seitens der TU Darmstadt sowie die Möglichkeit, diese unter seiner qualifizierten, fordernden und fördernden Leitung anzufertigen. Im gleichen Maße danke ich Dr. Björn Hock für die Leitung meiner Promotion bei Merck und die Möglichkeit diese in seiner Arbeitsgruppe in einem spannenden Themengebiet durchzuführen sowie seine Bereitschaft, jederzeit für Fragen zu Verfügung zu stehen.

Prof. Dr. Siegfried Neumann danke ich ganz herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Ralf Günther und Dr. Stefan Becker danke ich für die durchgängig gute Betreuung und konstruktive Kritik. Ganz besonders bedanke ich mich bei Stefan für seine geduldige Einführung in die theoretischen und praktischen Prinzipien der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung.

Der gesamten AG Kolmar sowie den Abteilungen PEAT und PCS danke ich für das besonders freundschaftliche und angenehme Arbeitsklima.

Ein herzlicher Dank gilt den Kollegen Than-Tan Huynh, Dr. Achim Doerner, Dr. Birgit Piater, Konsi, Anja, Anna, Nils, Angelika, Dominik und Christian, Marion, Pia, Elke, Kirsten und Sigrid für den umfangreichen fachlichen Austausch, die vielen neuen Ideen und den Spaß im Labor.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Björn, Alex, Thomas, Tim, Bernhard, Caro, Janine, Stefan, Franzi und Niklas die mich vom ersten Tag an herzlich in ihr Team integriert und aufgenommen haben. Ich habe nicht nur die gemeinsamen Seminare, Arbeitsgruppenausflüge und sonstigen Forschungsaufenthalte bei euch genossen. Barbara Diestelmann gilt ebenfalls ein herzliches Dankeschön für ihre umfangreiche organisatorische Hilfe jeglicher Art und die sehr netten Gespräche.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem geliebten Ehemann Jörg und meiner Familie für ihre grenzenlose Geduld und Unterstützung bedanken.